

PCEM 2- Cours de Biologie cellulaire n°8
Professeur : M. COHEN-SOLAL

Jeudi 13 Décembre 2007, 10h30

Ronéotypeur : DENIAU Benjamin

Communication intercellulaire :

Les Cytokines

SOMMAIRE

I/ INTRODUCTION

II/ MODE DE REGULATION DES CYTOKINES

III/ CLASSIFICATION DES CYTOKINES

- a) Comment étudier le rôle des cytokines ?
- b) Exemple des souris Knock-out

IV/ Les récepteurs des cytokines

- a) Les récepteurs membranaires
- b) Mécanismes d'action des récepteurs
- c) Les récepteurs couplés
- d) Les récepteurs solubles

V/ Transduction du signal

VI/ Modulation des effets des cytokines

VII/ Intéraction entre les cytokines

- a) Exemple de l'IL-1
- b) Exemple de l'IL-6
- c) Exemple du TNF α

♥: points importants soulignés par la prof

I/ Introduction

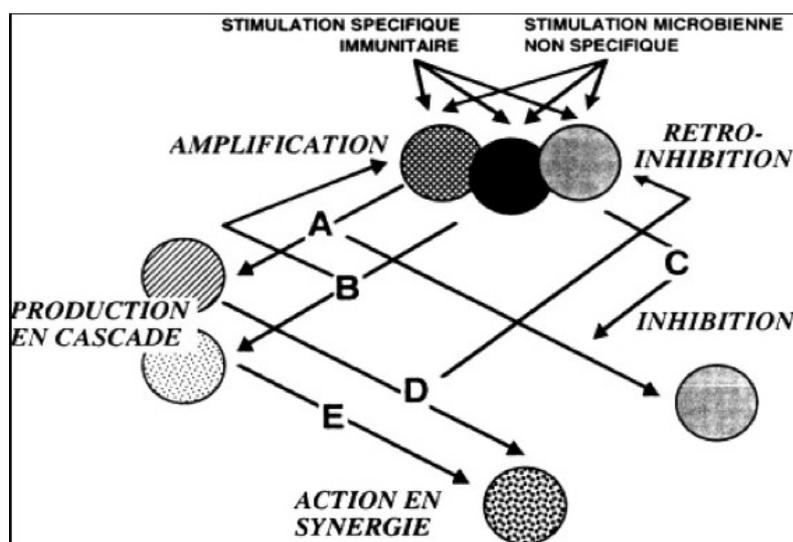
Les cytokines sont des facteurs solubles de communication entre les cellules, on parle de «langage cellulaire», qui sont majoritairement produites après une activation cellulaire et qui permettront d'induire la prolifération, la différenciation ou l'apoptose. C'est un système de communication entre les cellules qui permet **la régulation des grandes fonctions biologiques**.

Ce sont des **peptides**, médiés par un récepteur cellulaire, et qui ont différents modes d'action :

- **paracrine**: communication d'une cellule vers une autre cellule (ex: un lymphocyte va produire des cytokines qui vont avoir des effets sur les hépatocytes)
- **autocrine**: une cytokine qui a des effets sur une cellule du même type (ex: le monocyte produit des cytokines qui vont avoir des effets soit sur d'autres monocytes, soit un auto-effet, soit sur les cellules adjacentes)
- **juxtacrine**: il y a communication par contact membranaire (ex: l'ostéoblaste sécrète des cytokines membranaires reçues par le récepteur d'une autre cellule, comme par exemple le monocyte). C'est la régulation juxtacrine.
- **endocrine**: (appelé hormonal auparavant), une cytokine produite localement se retrouve dans la circulation générale et va avoir des effets sur une autre cellule à distance.

En résumé, les 3 premiers modes d'actions sont des modes d'action dits **locaux** alors que l'endocrinien est dit **à distance**.

II/ Mode de régulation des cytokines



Les cytokines ont un mode de régulation complexe. Il existe un réseau très serré entre **amplification**, **stimulation** et **inhibition**.

Sous l'effet d'une stimulation spécifique, ou non spécifique (ex: un microbe), une cellule peut agir sur une autre cellule (la cellule A va sécréter une cytokine qui agit sur une autre cellule A, ou sur une cellule B) qui va en retour en stimuler une autre. C'est ce que l'on appelle l'**amplification en cascade**, c'est à dire qu'à partir d'une seule cellule, on aura une action beaucoup plus importante.

On peut avoir une **rétro-inhibition** : une cellule va induire la sécrétion d'une cytokine qui va elle même en induire une autre qui sera à l'origine d'une **inhibition rétrograde** sur la cellule initiale.

Enfin, une cellule peut produire une cytokine et son inhibiteur, ce qui permettra d'avoir une balance et un effet cellulaire final.

En résumé, il existe plusieurs types de régulation:

- **Production en cascade** qui amène à une amplification des faits cellulaires
- **Rétro-inhibition**
- **Inhibition directe**

Ceci est valable pour quasiment toutes les cytokines si bien que cela forme **un réseau de communication** très large et complexe qui va au bout du compte induire à la régulation de la totalité des cytokines et des anti-cytokines.

III/ Classification des cytokines

Il existe 4 familles de cytokines que l'on classifie en général par rapport à leur mode d'action et leur structure :

- **Interleukines:** c'est la famille la plus large, pour l'instant on en a décrit 1 mais on en dénombre 24. Ces cytokines sont souvent redondantes, et peuvent avoir des effets totalement antagonistes.
- **Interférons:** ces cytokines sont classées dans 3 sous-classes qui sont l'interféron α , β et γ et appartiennent à un groupe très important dans la régulation immunitaire.
- **TNF (tumor necrosis factor):** ce groupe comporte 2 cytokines : $\text{TNF}\alpha$ (une des cytokines les plus importantes dans les processus inflammatoires) et le $\text{TNF}\beta$.
- **TGF:** avec le $\text{TGF}\alpha$ et le $\text{TGF}\beta$.

Attention (⚠): il faut faire la différence entre un facteur de croissance et une cytokine !! En réalité, il n'y a pas beaucoup de différence car ce sont tout les 2 des facteurs locaux qui vont médier l'action cellulaire. Mais on peut trouver dans la littérature que les cytokines sont des facteurs solubles et **non stockés**, alors que les facteurs de croissance sont aussi des facteurs solubles mais **stockés**.

a) Comment étudier le rôle des cytokines ? (important ♥)

On peut étudier leur rôle de différentes façons :

- **In vitro**: à l'aide d'une culture de cellules, on prend différents types cellulaires (cellules primaires ou immortalisées), et on va ajouter la cytokine de façon à voir si la cytokine stimule la **prolifération** ou la **différenciation**.

Il existe 2 variantes : on introduit soit la cytokine toute seule ou alors on ajoute une anti-cytokine qui va bloquer l'effet de la cytokine qui se trouve déjà dans le milieu.

- **Etudier l'expression des cytokines sur les tissus**: on fait soit une culture de cellules ou de tissus, et on va regarder l'**expression des ARNm** (donc des gènes) ou celle des **protéines**.
- **Modèles animaux** : ils permettent de mieux voir ce qui se passe in vivo, on va avoir recours d'abord à des souris sauvages (ce sont les plus utilisées car les plus facilement manipulables) puis à des souris génétiquement modifiées (elles sont appelées **knock-out** (souris invalidées) quand elles ont subi une délétion de gène, et **transgéniques** quand on induit une hyper-expression (càd qu'on injecte un gène qui est déjà exprimé qui permet alors de l'exprimer davantage soit un gène qui n'existe pas et que l'on va rajouter).

b) Exemple de souris knock-out



- **Délétion IL1 α** : cette souris est incapable d'avoir une réaction inflammatoire, et ne réagit pas non plus aux stimulus inflammatoires et aux agents pyogènes. Ceci permet alors de dire de manière sûre, chez la souris, ce qui médie la **réponse inflammatoire** est l'IL1 ainsi que la médiation de la **réponse fiévreuse**.
- **Délétion IL6** : cette souris présente une infection bactérienne très importante traduisant le fait qu'elle n'a plus de mécanisme de défense aux bactéries \Rightarrow IL6 est un des **médiateur de la réponse microbienne**. De plus, ces souris ont un taux d'anticorps viral élevé d'où la production d'AC nécessite IL6
- **Délétion IL10** : ici la délétion implique une **diminution de la croissance** (\Rightarrow IL10 est important pour la croissance) mais surtout ces souris ont une **entéro-colite** (\Rightarrow il y a donc une susceptibilité particulière du tube digestif des cellules qui n'ont plus l'IL10). Ceci a permis de comprendre ce qui se passait chez les hommes dans la maladie de Crohn où la recherche de gènes chez ces patients a montré une modification de l'expression de l'IL10.
- **TGF β** : ici, la délétion impliquait le **décès** de la souris dans les 24 jours (c'est donc un facteur majeur), et une **augmentation de l'inflammation tissulaire** (\Rightarrow TGF β favorise donc la cicatrisation)



- GP130 : c'est un AC associé à IL6 (par ex), dont la délétion impliquera des **troubles du développement cardiaque** spécifiquement et un **décès rapide** (16 jours).

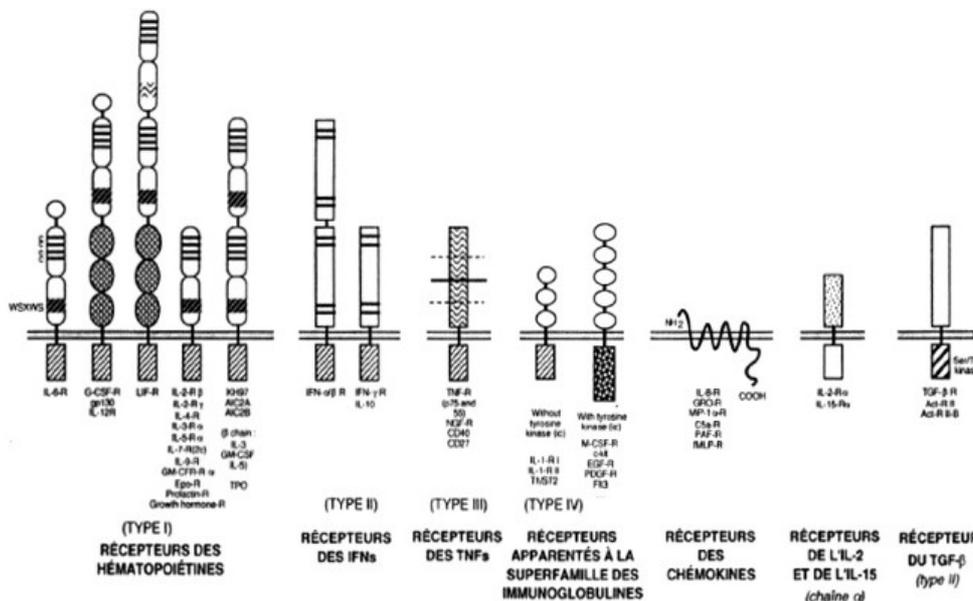
L'utilisation de ces souris modifiées knock-out nous apporte la preuve qu'il y a un **effet** et plus particulièrement important dans un tissu et pas un autre.

IV/ Les Récepteurs des cytokines

Les cytokines agissent sur des récepteurs qui sont de 2 types :

- **récepteurs membranaires** : Ces récepteurs ont soit un effet cellulaire **activateur** ou **inhibiteur** (ils activent ou inhibent le signal).
- **récepteurs solubles** : Ils sont présents dans le micro-environnement de la cellule et régule son action

a) Les récepteurs membranaires



Ces récepteurs sont regroupés en fonction d'une **structure primaire commune** dont en voici quelques exemples :

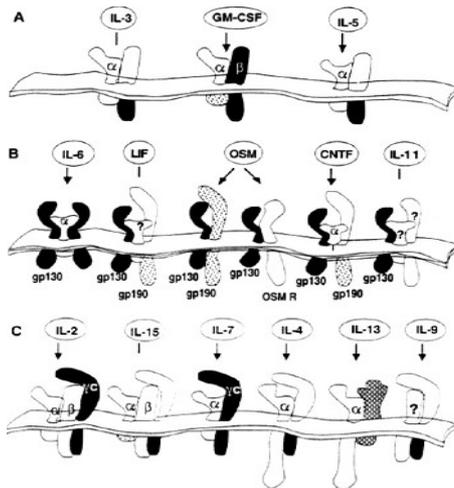
- récepteur des hématopoïétines : récepteur très simple, dont le domaine intracellulaire est toujours le même, avec des modifications du domaine extracellulaire qui va être reconnu par les cytokines. Cependant une partie de la structure du domaine extracellulaire est la même quelque soit le récepteur →
- récepteur des interférons : le type des récepteur sont très proche là aussi. Néanmoins, la

cytokine va spécifiquement reconnaître son récepteur.

- récepteur du TNF : structure très simple
- récepteur des immunoglobulines : de structure globulaire

b) Mécanisme d'action des récepteurs ♥

La liaison de la cytokine au récepteur se fait en général sur 1 des 2 chaînes :



pour le groupe A, le récepteur comporte 2 chaînes (α et β), alors que les récepteurs de la famille de IL6 comportent 3 chaînes différentes (α , β et est couplé à un co-récepteur qui est l'agp 130 ou 190).

La liaison au récepteur va se faire sur la chaîne α , qui permet alors son activation permettant le regroupement (**dimérisation**) de la chaîne β et/ou du co-récepteur associé (**trimérisation**). C'est l'activation de la **totalité** du complexe qui permettra d'entraîner le signal intracellulaire.

c) Les récepteurs couplés

Il existe 2 sortes de récepteurs couplés :

- récepteurs des tyrosine kinases : ces récepteurs activent en général la voie des MAPkinases ou voir de la RASKinase.
- récepteurs intracellulaires couplés aux sérine thréonine kinases

Exemple :

- Famille JAK : la cytokine va se lier, elle active une protéine qui fait partie de la famille JAK (constituée de différents domaines qui sont toujours les mêmes) et c'est le domaine 2 qui détient l'activité tyrosine kinase qui va elle pouvoir ensuite phosphoryler des protéines qui permettront d'activer le signal.

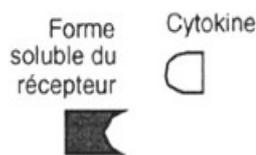


- Famille Src : ces récepteurs ont une structure un peu différente, formée de 2 domaines des liaisons SH2 et SH3, et un site catalytique SH1 (c'est ce site là qui va induire des modifications de conformation des protéines sous-jacentes et donc une activation du signal).



d) Les récepteurs solubles

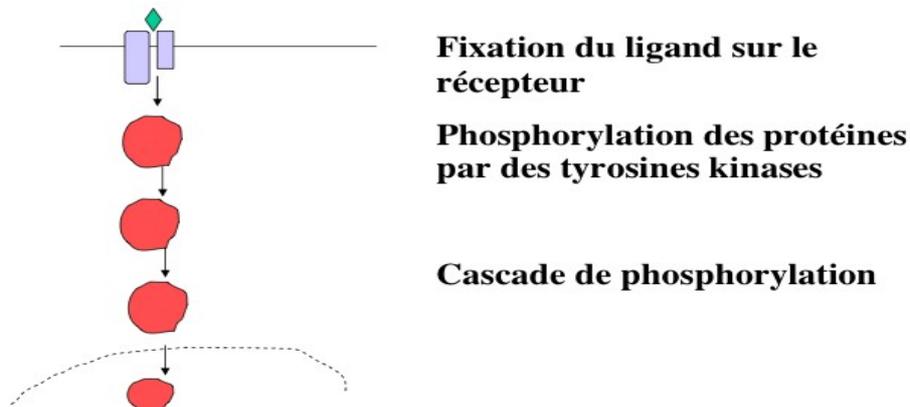
Ce sont des récepteurs se trouvant dans le micro-environnement et qui vont pouvoir se lier à la cytokine.



♥: Néanmoins, une fois liée au récepteur, la cytokine a une affinité beaucoup plus faible pour le récepteur soluble que le récepteur membranaire.

Ces récepteurs solubles résultent soit du **clivage protéolytique** de la forme membranaire, soit d'un **épissage alternatif** de l'ARNm des récepteurs au moment de la traduction (en fait c'est une forme incomplète où il manque la partie membranaire).

V/ La transduction du signal



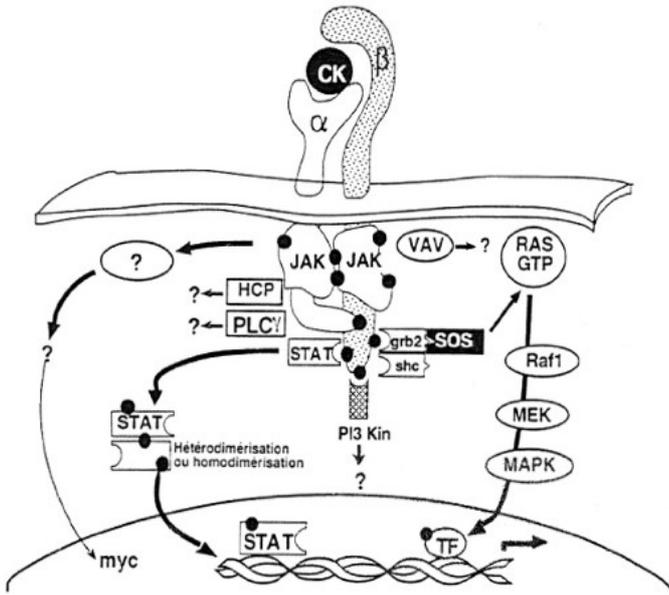
Une fois que le ligand (cytokine) se lie au récepteur, il va y avoir dimérisation des chaînes α et β activant la phosphorylation par les Tyrosine kinases (par ex) qui provoquera la phosphorylation d'une protéine à l'état latent dans le cytoplasme...etc \Rightarrow **cascade de phosphorylation** qui va conduire à l'activation de protéines qui vont ensuite se fixer sur le promoteur de gène (**facteur de transcription**) par translocation dans le noyau. La fixation de ce facteur sur le promoteur du gène permettra l'**activation** ou l'**inhibition** de la prolifération, de la différenciation ou apoptose.

\Rightarrow **le fonctionnement est toujours le même !!**

Cette transduction du signal va être réalisée par différentes protéines. Spécifiquement pour les cytokines, il existe 2 sortes de ces protéines :

- **STAT** : ce sont des molécules qui vont transmettre le signal et activer la transcription (**facteurs de transcription**). Elles sont présentes à l'état latent dans le cytoplasme, activées par phosphorylation sur un résidu **tyrosine** (par JAK).
- **JAK** : just another kinase

Il existe plusieurs groupes de ces protéines (familles), et en réalité ce sont plusieurs JAK ou plusieurs STAT qui sont activées par des cytokines. Autrement dit il n'y a **pas de spécificité** entre les cytokines et l'activation des protéines du signal, elles peuvent toutes être utilisées.



Sur ce schéma (où il n'y rien de nouveau), on retrouve bien l'activation des protéines JAK qui vont alors phosphoryler (activer) des protéines STAT.

Cependant, JAK va aussi aller activer une petite protéine **VAV** qui va elle activer une autre voie : voie de la **MAPK**.

VI/ Modulation de l'effets des cytokines

L'effet des cytokines peut être modulé (amplification ou diminution) en agissant sur :

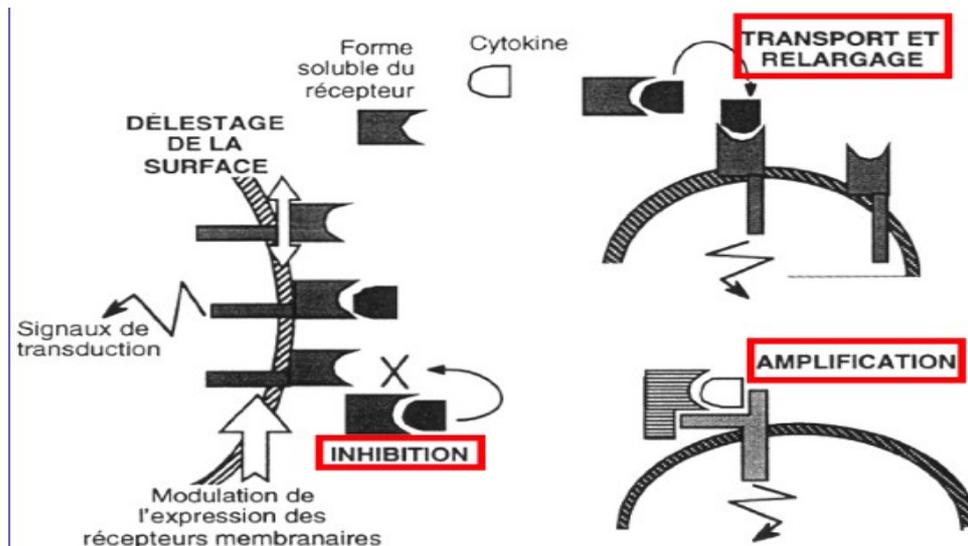
- les récepteurs membranaires : en modulant leur nombre
- les récepteurs solubles : idem
- en modulant les protéines du signal cellulaire

Il existe 4 moyens de moduler ceci :

1-Mise au repos du système d'activation

Par **internalisation** ou **phosphorylation** des récepteurs **membranaires**. Par exemple, s'il y a trop d'afflux de cytokines, il va y avoir internalisation, à l'intérieur de la cellule, du récepteur. Et ainsi la cytokine n'a plus aucun effet sur la cellule. C'est un mécanisme **très fréquent**.

2- En jouant sur les récepteurs solubles



Ces récepteurs

ont 3 rôles essentiels sur lesquels on peut agir:

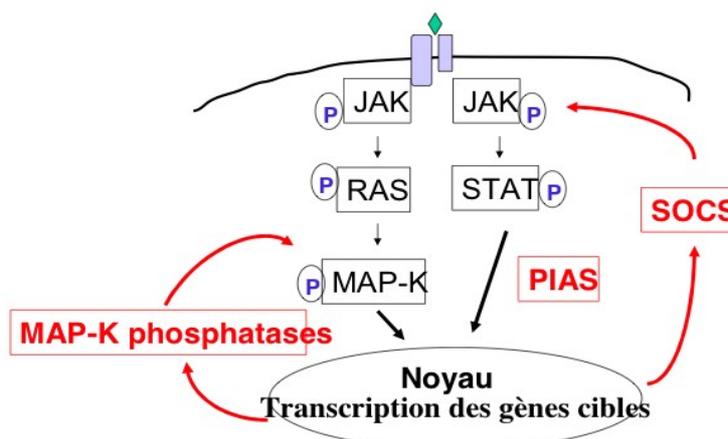
- **Inhibition** : la cytokine se lie au récepteur soluble et va activer une cascade de signalisation (→ la cytokine ne se lie pas au récepteur membranaire). Ces récepteurs ont alors un rôle d'**antagoniste**.
- **Voie de stockage des cytokines** : toujours en se fixant à la cytokine, le récepteur empêche la dégradation de cette dernière (indirectement, le récepteur a un rôle de **relargage et de transport**).
- **Amplification** : la cytokine, portée par un récepteur soluble, peut en même temps se lier au récepteur membranaire (→ **Augmentation du signal**). Ici le récepteur a un rôle d'**agoniste**

♥: En résumé, ces récepteurs solubles ont 3 fonctions majeures :

- inhibition
- stockage (permettant transport et relargage)
- amplification

Aujourd'hui, des applications thérapeutiques utilisent ces récepteurs.

3-Inhibition de la voie de signalisation intracellulaire



On sait maintenant qu'une cytokine va se lier spécifiquement à son récepteur, permettant ainsi l'activation de protéines appelées JAK qui ont la capacité de phosphoryler. Ainsi JAK phosphorylé va induire la voie de signalisation des MAPK ou des STAT. Ces deux voies induisent à la transcription des gènes dans le noyau.

♥ : On peut alors moduler ces voies de signalisation par un mécanisme spécifique :

- **Rétrocontrôle négatif** : lorsque ces voies d'activation sont trop activées, (alors suivies de transcription de gènes trop intense), il y aura induction d'autres enzymes que sont les **MAPK phosphatases** (qui vont alors inhiber les MAPK dans la voie des MAPK)

et les **SOCS** (qui inhibent la voie STAT).

- **Les PIAS** : des protéines (plus exactement des STAT), qui vont réguler la **translocation** des facteurs de transcription.

En résumé, 3 mécanismes qui limitent la transcription des gènes :

- MAPK phosphatases pour la voie MAPK
- SOCS pour la voie STAT
- PIAS pour la voie STAT

4-Mise au repos de l'activation de la voie de transduction

Ceci correspond soit à une **inactivation enzymatique** soit une **déphosphorylation de JAK**.

♥: il est important de retenir qu'au jour d'aujourd'hui, de nombreuses molécules capables de limiter l'inflammation, sont utilisées en **biothérapie** et qui vont cibler les récepteurs membranaires ou solubles. En effet, il existe sur le marché des molécules qui ciblent le domaine extracellulaire du récepteur, et à l'état de recherche, des molécules qui vont réguler les différentes voies étudiées ci-dessus (SOCS et MAPK).

VII/ Interactions entre les cytokines

Une cytokine peut interférer avec d'autres cytokines :

- diminution des récepteurs membranaires
- diminution des protéines de signalisation
- compétition pour protéines de signalisation communes
- activation de phosphatases
- compétition de facteurs de transcription pour la fixation

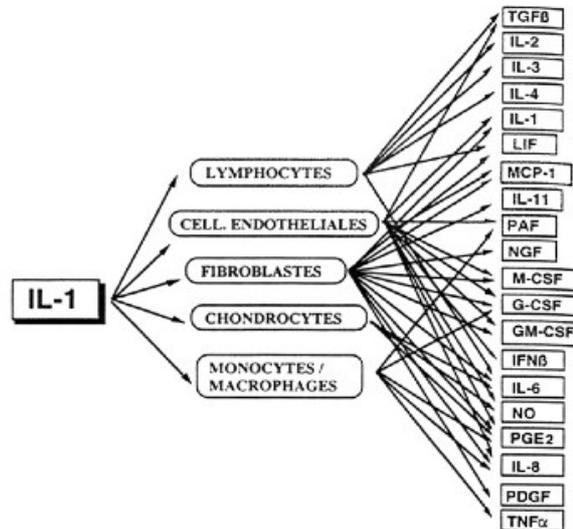
à un élément de réponse chevauchant (facteurs de transcription ubiquitaires qui se fixe sur les éléments de réponses des gènes)

- compétition avec un co-activateur transcriptionnel

a) Exemple 1 : IL-1

Généralités

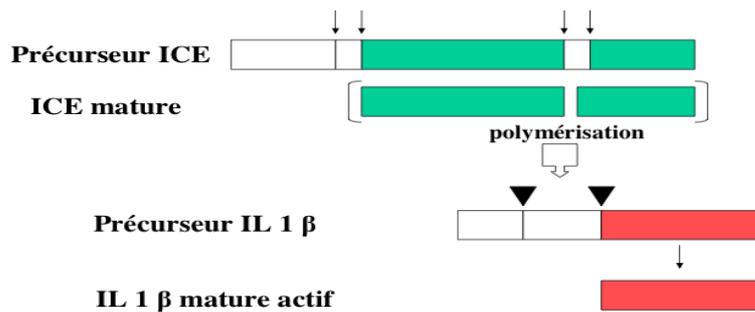
Cette interleukine est produite par de très nombreuses cellules (presque tout les types cellulaires). Elle a la capacité d'activer toutes ces cellules qui en retour vont produire des cytokines plus spécifiques.



On voit bien sur le schéma qu'à partir d'une seule production de cytokine, on a beaucoup plus de cytokines produites.

Il existe 2 sortes IL-1 : α et β qui présentent environ 25% d'homologie. (Chez l'homme, IL1 α est la forme stockée alors que la forme β est celle qui est relarguée, libérée).

Pour ce qui est de la synthèse, IL1 est maturée, synthétisée à partir d'un précurseur. La maturation de l'IL1 se fait grâce à une enzyme : ICE.

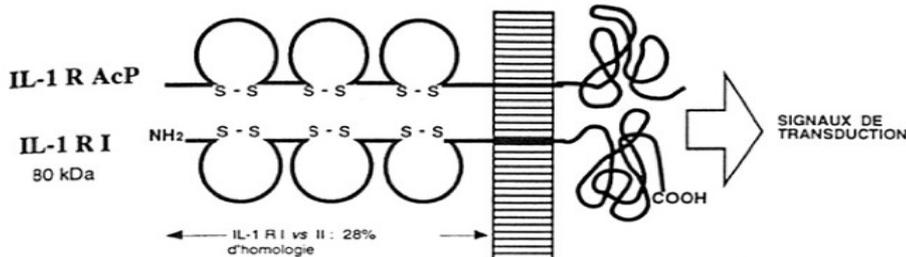


Le précurseur ICE va subir un **clivage protéolytique** qui va aboutir à l'ICE mature. C'est cette ICE (mature) qui va se polymériser et qui va couper la forme immature non fonctionnelle de IL1 en forme mature fonctionnelle.

Cependant, ICE présente une autre fonction au cours de l'**apoptose**. En effet, ICE fait partie de la famille des **caspases** (famille de protéases) : c'est la caspase 1 (car elle clive IL1). L'ICE reconnaît les sites aspartates et un autre résidu hydrophobe en P4. Chez les souris knock-out pour ICE, le développement est normal, mais il y aura une diminution de l'apoptose chez les cellules du tissu nerveux (avec diminution des dégénérescences neuronales dans ce tissu). On en conclut alors que l'ICE est à l'origine de l'apoptose de certaines cellules du tissu nerveux.

Les 2 récepteurs à IL-1

- **récepteur responsable du signal** : il est constitué du récepteur IL1R1 et d'un récepteur accessoire. Quand IL1 se fixe, il entraîne la dimérisation de ces 2 récepteurs et une transduction du signal.



- **récepteur qui n'induit pas de signal** : il s'agit d'un récepteur ILR2 (appelé un decoy récepteur, ou récepteur leurre, ou recept-leurre). IL1 reconnaît bien le domaine extracellulaire, mais l'intracellulaire est trop petit et n'induit pas de signal.

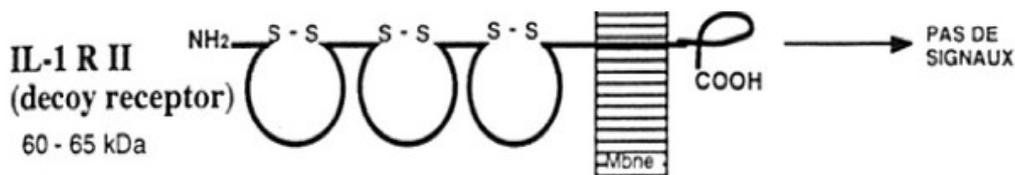
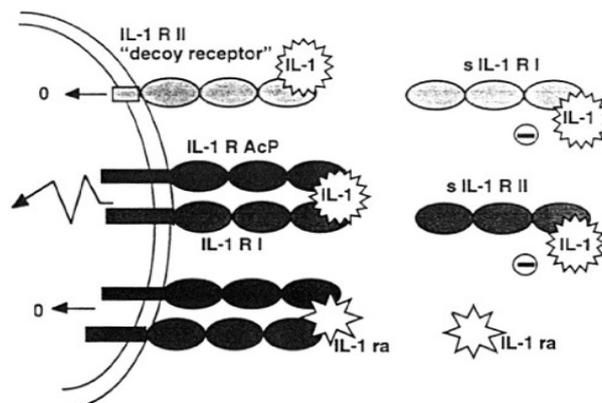


Schéma récapitulatif des récepteurs à IL-1



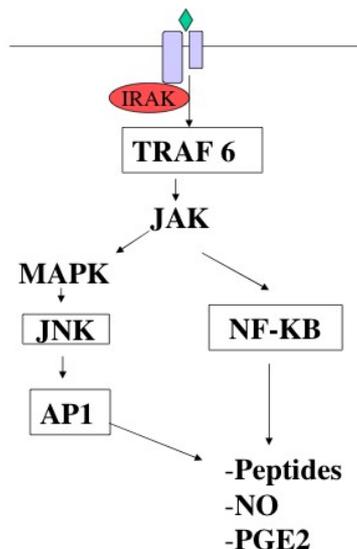
Les 2 premiers dessins ont été vus ci-dessus. Sur le 3ème, en fait, IL-1 s'est lié à un récepteur soluble. Ce récepteur est antagoniste et se nomme **IL1Ra**. C'est une molécule qui a une forme très proche de IL1 et qui va se lier au propre récepteur de IL1. Sa liaison n'entraînera **pas de signal**.

En résumé, on a plusieurs façons de bloquer IL-1 :

- par les récepteurs solubles
- par les récepteurs antagonistes

♥: En biothérapie, on traitera le patient avec des molécules chimiques telles que les anti-cytokines, mais aussi des récepteurs antagonistes de IL-1 (aujourd'hui sur le marché sous le nom d'ANAKINRA, et utilisé dans des maladies inflammatoires rhumatologiques). Et sont en cours de développement, des récepteurs solubles de l'IL-1.

Transduction du signal de IL-1 ♥



IL-1 va transmettre une réponse cellulaire grâce à plusieurs voies de signalisation, en se fixant à son récepteur et en activant une protéine : **IRAK**. Cette dernière va à son tour activer une autre protéine, qu'est la molécule adaptatrice **TRAF6**.

Voici 2 voies de signalisation (parmi beaucoup d'autres !!) qui sont activées dans cette voie :

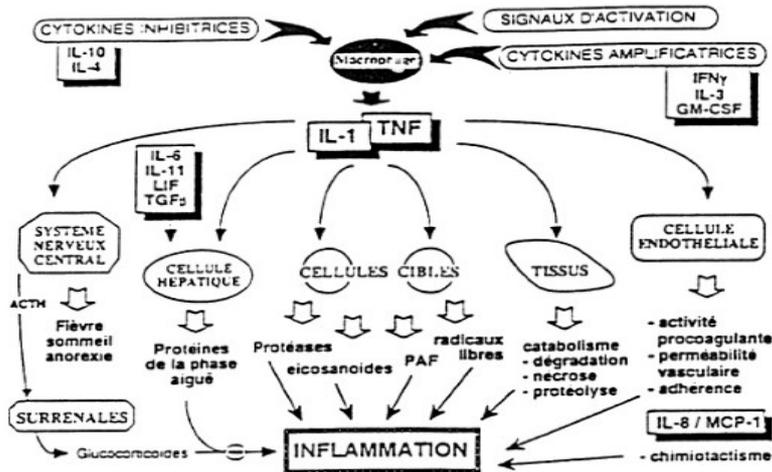
- MAPK avec JNK
- NFKB (dont il existe des inhibiteurs spécifiques qui sont en cours de développement chez les humains (ex : IKK))

Activité de IL-1

L'IL-1 a un effet ubiquitaire sur différents tissus :

- Modulation de la réponse inflammatoire : activation des lymphocytes B et T et production d'anticorps ♥
- **SNC**: fièvre et sommeil ♥

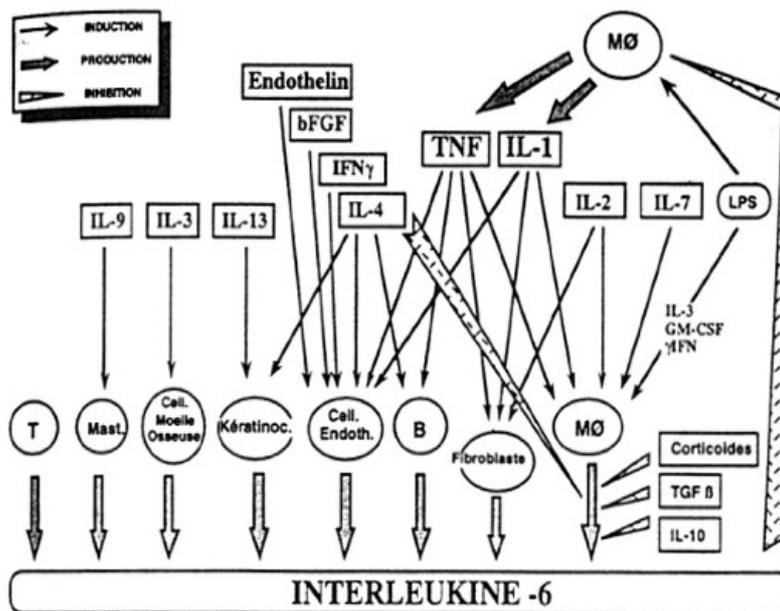
- **Cardio-vasculaire**: adhérence des leucocytes aux vaisseaux (diminue la diapédèse)
hypotension
- **Métaboliques** : absorption des lipides, excrétion du Na et synthèse d'albumine
- **Cellulaires**: prolifération des lymphocytes B et des kératinocytes



b) Exemple 2 : IL-6

Généralités

IL-6 est produite elle aussi par de nombreuses cellules (lymphocytes, kératinocytes,...) sous l'effet d'autre cytokines après stimulation (en particulier après stimulation par TNF et IL-1). Elle comporte 2 chaînes : α et β .

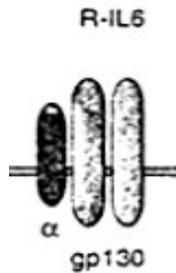


Chez les souris knock-out pour IL-6, il ne se passe généralement pas grand chose.

Récepteurs à IL-6

Il existe 4 sortes de récepteurs qui vont être capables de lier chacune des cytokines de façons spécifiques.

L'IL-6 va venir se lier sur la chaîne α du récepteur, qui dimerise alors la chaîne β qui va entraîner la co-activation du récepteur associé (ou co-récepteur) : **gp130**. C'est l'activation globale qui entrainera le signal intracellulaire.



♥ IL-6 va avoir des actions très variées sur de nombreux tissus. C'est à dire que IL-6 n'aura pas de spécificité d'action tissulaire.

c)Exemple 3 : le TNF α ♥

Généralités

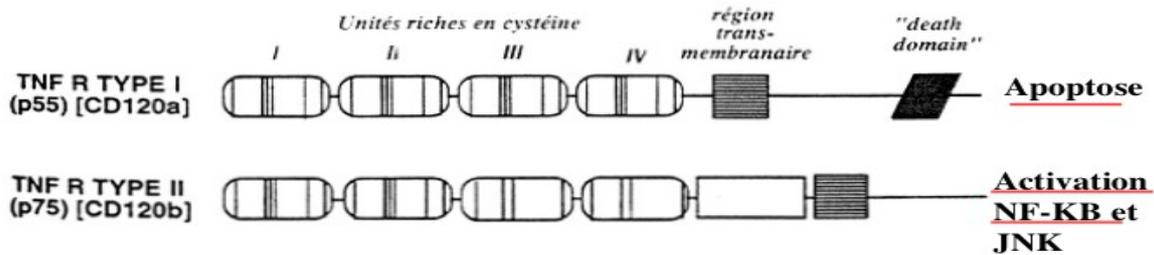
Le TNF est lui aussi produit de façon ubiquitaire. Il va se fixer sur son récepteur.

Les récepteurs au TNF

Il existe 2 types de **récepteurs membranaires** (présents dans quasiment toutes les cellules) au TNF :

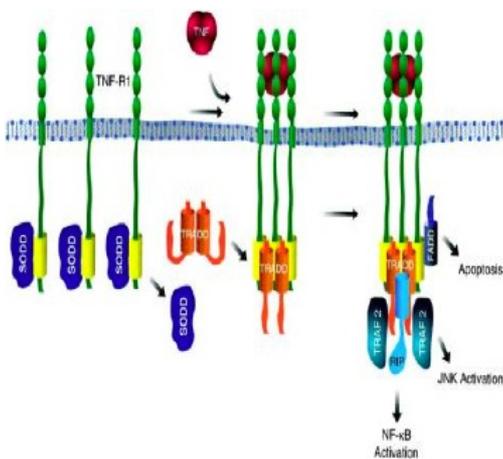
- **TNFR1** : appelé aussi p55, responsable du signal d'apoptose de par son domaine de mort dans le domaine intracellulaire.
- **TNFR2** : appelé p75, il active les voies de signalisation de NF κ B et JNK.

Mais on aura aussi des **récepteurs solubles**, qui vont se lier au TNF. A forte dose, ils inhibent l'action du TNF, alors qu'à faible dose ils n'inhibent que très peu cette action (favorisant alors le stockage local).

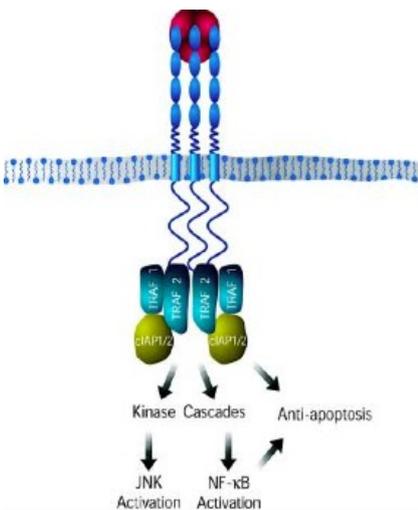


♥: encore une fois, il est important de retenir ceci, car on utilise déjà ces produits en clinique !! Et en fonction de l'utilisation du TNFR1 ou du TNFR2, on aura des réponses cellulaires un peu différentes. (ex : la liaison du TNF au TNFR1 induira l'apoptose).

Voies d'activation du TNF



La liaison du TNF à son récepteur va entraîner une dimérisation de ce dernier, qui va elle entraîner l'activation de NF-kB, de la JNK ainsi que celle de la voir de l'apoptose.



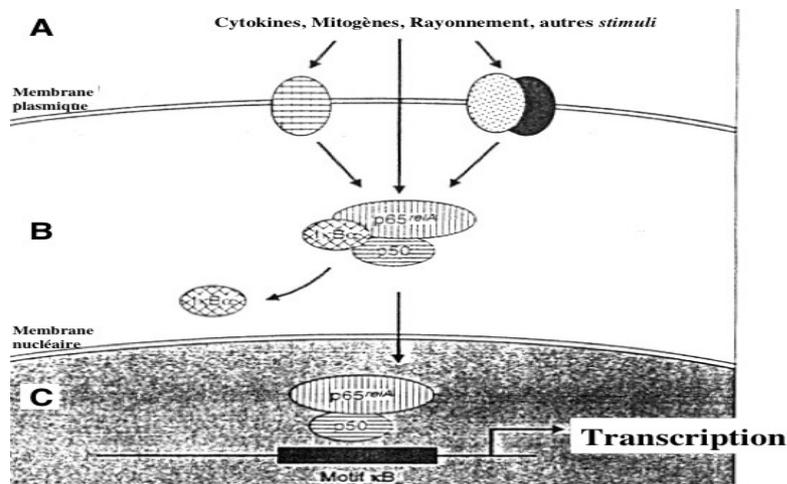
En revanche, l'activation du récepteur entraîne sa trimérisation, qui induit l'activation de NF-kB, de la JNK mais par contre pas d'activation de l'apoptose. C'est un **anti-apoptotique**.

♥: ces mécanismes (encore et toujours), sont importants, car si on peut inhiber l'apoptose en clinique, on utilisera un inhibiteur du TNFR1.

Une des voies de signalisation activée par le TNF est la voie du NF-kB : c'est un complexe cytoplasmique qui comporte différentes sous-unités (avec au moins p65), avec toujours un

inhibiteur de NF κ B : I κ B. Ce dernier est toujours lié au complexe.

Lorsqu'il y a liaison du TNF à son récepteur, on va avoir un relargage de I κ B qui se fait par **phosphorylation** de NF κ B (la phosphorylation de NF κ B induit le relargage d'I κ B). Ainsi le complexe p65/p50 libre, va se transloquer dans le noyau entraînant la transcription de gènes de **l'inflammation**.



Rôle du TNF

Le TNF a un rôle métabolique. Il existe, en cas de choc septique, beaucoup de TNF circulant : **hypercatabolisme**. Il aura des rôles différents sur : tissu vasculaire, la peau, le foie, le poumon, la lyse osseuse, la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn (où le TNF joue un rôle dans l'inflammation. On utilise dans ce genre de maladies, des anti-TNF).