

1^{ère} partie Principes généraux » 03

1. La signalisation intracellulaire ou réseau de protéines intracellulaire de signalisation » 05

2. La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs couplés aux enzymes » 06

- Signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G » 06
- La signalisation par les récepteurs couplés aux enzymes » 07

3. Les voies de signalisation intracellulaires » 08

- Les voies des MAP kinases » 08
- La voie de PI3 kinase/Akt » 08
- La voie de NF- κ B » 08
- La voie JAK/STAT » 09
- La voie des récepteurs TLR » 10
- La voie des récepteurs intracellulaires NOD et de l'inflammasome NLRP3 » 11

2^e partie Comment explorer les voies de signalisation » 13

1. Comment mettre en évidence une phosphorylation » 13

2. Comment mettre en évidence d'une interaction protéine-protéine » 14

- L'immunoprécipitation » 14
- FRET ou transfert d'énergie entre molécules fluorescentes » 15
- Etude fonctionnelle » 16

3^e partie Les voies de signalisation intracellulaire en pathologie : quelques exemples de maladies inflammatoires » 16

1. NF- κ B et maladies inflammatoires » 16

2. MAPK et maladies inflammatoires » 17

3. NOD, NLRP et maladies auto-inflammatoires » 17



4^e partie Implications thérapeutiques dans la polyarthrite rhumatoïde » 18

- 1. Données générales » 18
- 2. Inhibition de p38 MAPK » 18
- 3. Inhibition des JAK » 19
- 4. Inhibition de Syk » 19



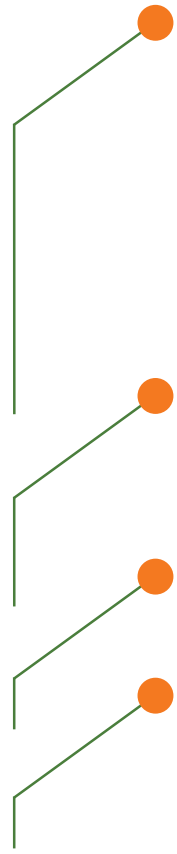
5^e partie Points forts » 20 Quelques questions » 21



6^e partie Lexique » 21



7^e partie Pour en savoir plus » 22



LES COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES PAR LES VOIES DE SIGNALISATION

Hang Kong Ea, Frédéric Lioté

Université Denis-Diderot, Paris VII, Centre Viggo Petersen, Hôpital Lariboisière,
Paris

La transduction du signal permet à une cellule de répondre et de s'adapter aux stimuli provenant des autres cellules et de l'environnement. La liaison du signal extracellulaire (ou ligand) qui peut être une cytokine inflammatoire ou non, un composant microbien, une structure microparticulaire, un acide aminé, un nucléotide, un gaz, etc... à son récepteur spécifique déclenche une cascade d'activation de protéines intracellulaires aboutissant à une modification du comportement de la cellule. Le récepteur est souvent situé à la surface de la cellule mais peut aussi être intracellulaire. L'activation des protéines intracellulaires, médiée principalement par des protéine-kinases, peut suivre plusieurs voies de signalisation intracellulaire dont les principales sont la voie des MAPK (*mitogen-associated protein kinases*), de NF- κ B (*nuclear factor κ B*), de l'interféron (IFN), des voies dépendantes du calcium et des récepteurs Toll (TLR), des récepteurs NOD-like et de l'inflammasome, et la voie des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K). De nombreuses maladies inflammatoires rhumatologiques ont une altération de la signalisation intracellulaire. Ainsi, une meilleure compréhension de ces différentes voies permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques avec l'utilisation de petites molécules capables de réguler les protéines de signalisation.

Un organisme pluricellulaire doit communiquer pour survivre. Chaque cellule reçoit une multitude de signaux extracellulaires provenant d'autres cellules et de l'environnement. L'intégration par la cellule de ces informations dépend non seulement de ces récepteurs (protéines de reconnaissance du signal), mais aussi de protéines de signalisation intracellulaire qui distribuent le signal dans la cellule. La transduction du signal est l'ensemble des événements intracellulaires déclenchés par la liaison du signal à son récepteur jusqu'à la réponse cellulaire. Les protéines de signalisation intracellulaire comportent des kinases, des phosphatases, des protéines de liaison au GTP (guanosine triphosphate) et beaucoup d'autres protéines avec lesquelles elles interagissent. Le signal se traduit par une modulation de la croissance, la prolifération ou la mort cellulaire, la différenciation, la migration et l'activation cellulaires, la réponse immune ou d'autres fonctions cellulaires via la régulation de gènes codant pour des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des protéases, etc...

Le but de ce chapitre n'est pas d'étudier de façon exhaustive les voies de signalisation, mais d'en résumer les principes généraux, de présenter les principales voies de signalisation (AMP cyclique, PKA et PKC, MAPK, NF- κ B, TLR, NOD, inflammasome NLRP3, JAK-STAT, IFN et PI3K), et certaines voies régulatrices, et de signaler quelques pistes thérapeutiques.

1^{ère} partie Principes généraux

■ Les « médiateurs » de la communication cellulaire

La communication cellulaire permet à une cellule d'influencer le comportement d'une autre cellule. Elle se fait au moyen de centaines de molécules qui peuvent être des protéines, des petits peptides, des acides aminés, des nucléotides, des dérivés des acides gras, des cytokines inflammatoires, des structures microparticulaires, des gaz dissous comme le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO), etc... Ces molécules peuvent être solubles, fixées sur la matrice extracellulaire ou sur la surface d'une cellule voisine et peuvent agir selon plusieurs millions de combinaisons.

■ Les « récepteurs » cellulaires

La cellule répond sélectivement par des récepteurs spécifiques. Dans la plupart des cas, ces récepteurs sont des protéines transmembranaires situées à la surface de la cellule cible. Lorsqu'ils fixent la molécule de signalisation extracellulaire (ou le ligand), ils s'activent et engendrent une cascade de signaux intracellulaires qui modifient le comportement de la cellule **Figure 1**. Dans d'autres cas, les récepteurs sont intracellulaires et les molécules de signalisation doivent entrer dans la cellule pour les activer : ces molécules sont dans ce cas suffisamment petites et hydrophobes (ou gazeuses) pour diffuser au travers de la membrane plasmique. C'est le cas par exemple des récepteurs pour les hormones stéroïdiennes, des récepteurs de la vitamine D ou encore des récepteurs aux oestrogènes.

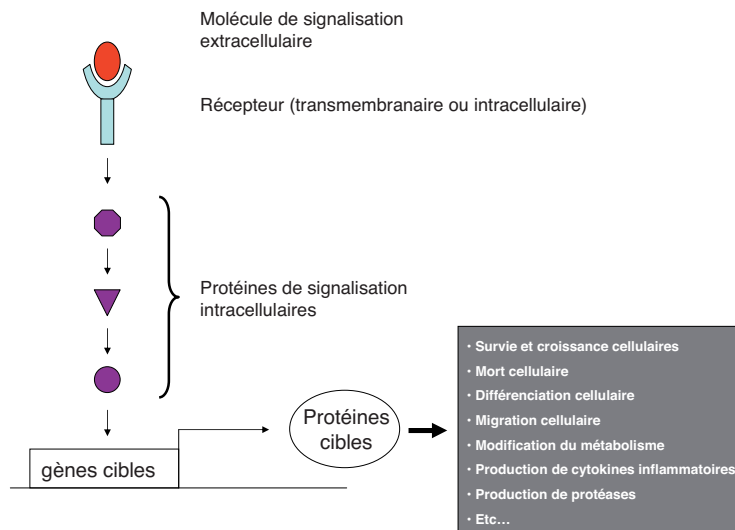


Figure 1. Schéma général de la signalisation intracellulaire. La molécule de signalisation se fixe sur une protéine spécifique, ou récepteur (généralement transmembranaire mais peut être intracellulaire), et active ainsi une voie de signalisation intracellulaire qui est mise en jeu par l'intermédiaire d'une cascade de protéines de signalisation. Ces protéines de signalisation activent des gènes cibles et la production de protéines spécifiques qui vont moduler le comportement de la cellule.

Il y a trois familles principales de récepteurs cellulaires de surface, qui effectuent chacun différemment la transduction des signaux extracellulaires **Figure 2**.

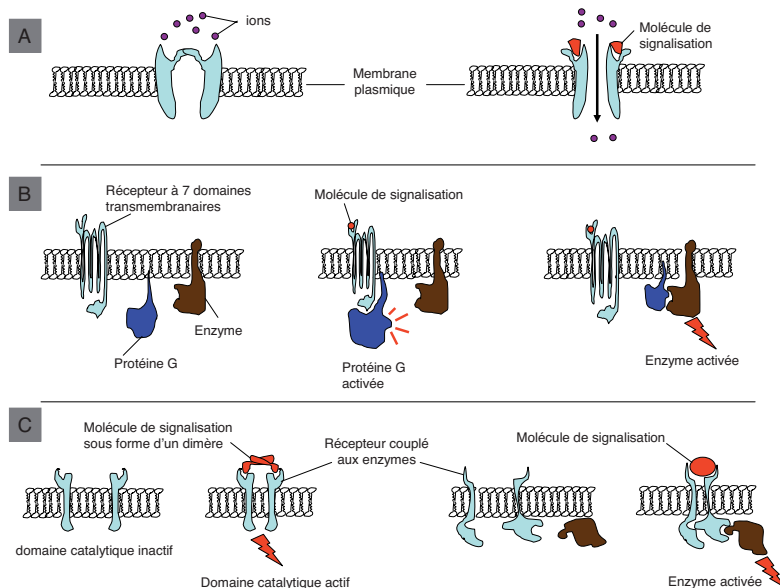


Figure 2. Trois classes de récepteurs cellulaires de surface (adapté de « Biologie moléculaire de la cellule », 4^{ème} édition, Médecine-science, Flammarion, 2004). (A) Les récepteurs couplés aux canaux ioniques. (B) Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. (C) Les récepteurs couplés aux enzymes. Après la fixation de la molécule de signalisation extracellulaire, les récepteurs couplés aux enzymes peuvent avoir une activité enzymatique intrinsèque (schéma de gauche) ou recruter et activer une enzyme associée (schéma de droite).

- Les récepteurs couplés aux canaux ioniques sont impliqués essentiellement dans la signalisation synaptique rapide entre les cellules électriquement excitables.

Ce type de signalisation s'effectue par l'intermédiaire de neurotransmetteurs qui ouvrent et ferment transitoirement le canal ionique formé par des protéines à plusieurs domaines transmembranaires.

- Les récepteurs couplés aux protéines G régulent directement l'activité d'une autre protéine liée à la membrane plasmique, qui peut être soit une enzyme soit un canal ionique.

L'interaction entre le récepteur et la protéine se fait par l'intermédiaire de la protéine trimérique de liaison au GTP (ou protéine G) **Figure 2B**. Tous les récepteurs couplés à la protéine G appartiennent à une grande famille de protéines homologues à 7 domaines transmembranaires.

- Les récepteurs couplés aux enzymes, lorsqu'ils sont activés, fonctionnent directement comme une enzyme ou sont directement associés aux enzymes qu'ils activent **Figure 2C**. Ils sont formés de protéines à un seul domaine transmembranaire qui ont leur site de liaison au ligand situé à l'extérieur de la cellule et leur site catalytique ou de liaison enzymatique situé à l'intérieur. La grande majorité de ces récepteurs sont des protéine-kinases, ou sont associés à des protéine-kinases et les ligands qui s'y fixent provoquent la phosphorylation de groupes spécifiques de protéines dans la cellule cible.

1. La signalisation intracellulaire ou réseau de protéines intracellulaire de signalisation

- **La transmission du signal dans les cellules**

Une fois activés, les récepteurs couplés aux enzymes ou à la protéine G transmettent le signal à l'intérieur des cellules en activant des chaînes de protéines de signalisation intracellulaire. C'est un véritable système d'engrenages. Les petites molécules de signalisation intracellulaire sont appelées petits médiateurs intracellulaires ou seconds messagers. Elles sont synthétisées en grand nombre en réponse à l'activation des récepteurs et diffusent rapidement loin de leur source pour transmettre le signal aux autres parties de la cellule. Certaines, comme l'AMP cyclique ou le Ca^{2+} , sont hydrosolubles et diffusent dans le cytoplasme tandis que d'autres, comme le diacylglycérol (DAG), sont liposolubles et diffusent dans le plan de la membrane plasmique.

- **Les protéines de signalisation**

Les protéines de signalisation forment un véritable réseau, qui peut aussi être comparé à un réseau informatique, pour relayer le signal extracellulaire jusqu'au noyau nucléaire où elles se lient à des facteurs de transcription et induire l'expression de gènes cibles. Ces protéines s'interagissent, se chevauchent et peuvent souvent activer plusieurs voies de signalisation. Elles ont de multiples fonctions. Certaines relayent le signal, d'autres transportent le signal d'une partie de cellule à une autre, d'autres servent d'adaptateur, d'amplificateur ou de transducteur en convertissant le signal reçu en une autre forme, d'autres permettent le regroupement de plusieurs protéines en créant un véritable échafaudage, d'autres enfin modulent l'action d'autres molécules.

- **L'activation/désactivation par phosphorylation/déphosphorylation des protéines de signalisation**

La plupart des protéines de signalisation se comportent comme des commutateurs moléculaires. Elles passent d'un état inactif à un état actif et vice versa à la réception de signal spécifique. Il existe deux classes principales de commutations moléculaires qui agissent de façon différente, mais dans les deux cas, l'état fonctionnel de la protéine de signalisation est déterminé par la perte ou le gain d'un groupement phosphate **Figure 3**.

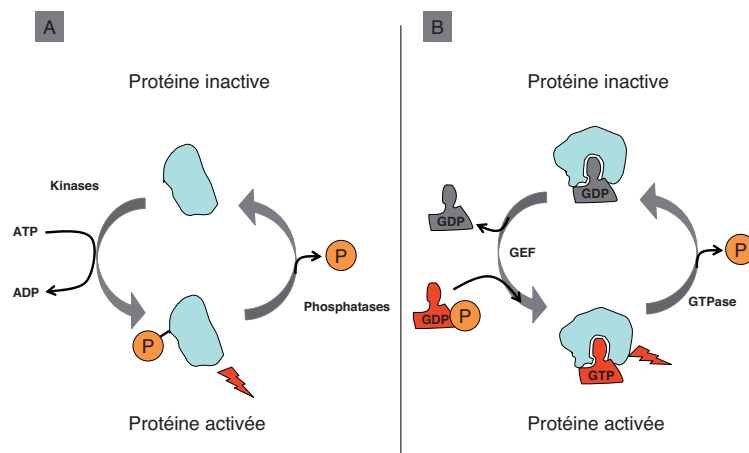


Figure 3. Activation par addition d'un groupement phosphate. (A) La protéine de signalisation est activée par phosphorylation par une protéine-kinase. Elle est inactivée par une phosphatase qui élimine le groupement phosphate. (B) Activation de la protéine de signalisation par l'intermédiaire d'un échange entre son GDP lié par un GTP. Elle se déroule sous l'action d'un facteur d'échange des nucléotides guanyliques ou GEF (*guanine exchange factor*). La protéine activée possède une activité GTPasique intrinsèque qui hydrolyse son GTP en GDP, ce qui l'inactive.

● **La plupart des protéines de signalisation sont activées ou inactivées par phosphorylation ou déphosphorylation**

Le groupement phosphate est ajouté par une protéine-kinase alors qu'une protéine-phosphatase le soustrait de la protéine de signalisation. La protéine de signalisation activée par phosphorylation est le plus souvent elle-même une protéine-kinase, ce qui explique les cascades de phosphorylations. La protéine-kinase activée phosphoryle une autre protéine-kinase qui a son tour active une autre protéine-kinase, et ainsi de suite, amplifiant et disséminant le signal vers l'avant. Les protéine-kinases sont classées en fonction de leurs sites de phosphorylation. Les sérine/thréonine-kinases phosphorylent les protéines sur les sérines et les thréonines et les tyrosine-kinases sur les tyrosines.

● **L'autre catégorie de commutateur moléculaire est constituée des protéines liées au GTP**

La protéine est active lorsqu'elle est liée au GTP. Lorsqu'elle est activée, la protéine possède une activité GTPasique intrinsèque et elle s'inactive elle-même en hydrolysant le GTP en GDP. Il existe deux groupes de protéines de liaison au GTP : les protéines trimériques de liaison au GTP (ou protéines G) qui relayent le signal transmis par les récepteurs couplés aux protéines G et les petites protéines GTPases monomériques. Celles-ci peuvent transmettre le signal intracellulaire comme la protéine Ras mais sont surtout impliquées dans le transport vésiculaire.

● **2. La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs couplés aux enzymes**

2.1. Signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G

● **La structure des récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Ils forment la plus grande famille des récepteurs cellulaires de surface. Lorsqu'ils sont activés, ils subissent une modification de conformation et activent les protéines G. Les protéines G sont composées de trois sous-unités protéiques (α , β , et γ). Lorsque le récepteur est activé, la sous-unité α libère son GDP pour se lier au GTP. Cette liaison avec le GTP provoque la dissociation des trois sous-unités en deux composants actifs (la sous-unité α et un complexe $\beta\gamma$) qui vont stimuler soit des enzymes soit des canaux ioniques de la membrane plasmique. La sous-unité α possède une activité GTPasique. Lorsqu'elle hydrolyse son GTP en GDP, elle se réassocie à un complexe $\beta\gamma$ pour réformer un trimère inactif.

● **Le rôle des récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G activent de nombreuses voies intracellulaires **Figure 4**.

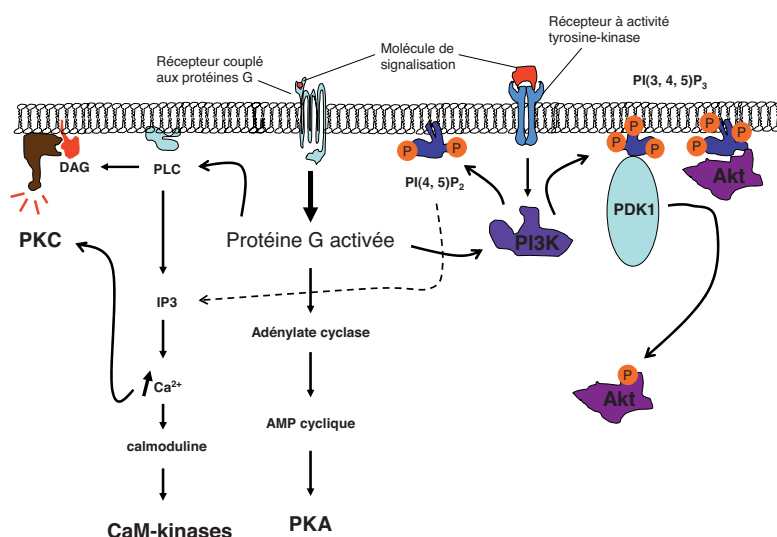


Figure 4. Quelques voies de signalisations activées par les récepteurs couplés aux protéines G. La liaison du signal extracellulaire au récepteur couplé aux protéines G active celles-ci. L'activation de la protéine G stimule l'adénylate cyclase qui produit une augmentation de l'AMP (adénosine monophosphate) cyclique induisant l'activation de la protéine-kinase A (PKA). D'autres récepteurs peuvent induire la phospholipase C (PLC) aboutissant à la production de l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 augmente le Ca²⁺ intracellulaire via le relargage du Ca²⁺ stocké dans le réticulum endoplasmique. Le Ca²⁺ intracellulaire peut stimuler directement la protéine-kinase C (PKC) qui est aussi stimulée par le DAG et/ou se lier à la calmoduline et activer les protéine-kinases Ca²⁺/calmoduline dépendantes (CaM-kinases). Les protéines G peuvent aussi activer la phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3) kinase tout comme les récepteurs à activité tyrosine-kinase. PI3K activé induit la production de phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate (PI (4, 5) P₂) et de (PI(3,4,5)P₃). Ce dernier recrute alors la protéine-kinase B (ou Akt) et la protéine-kinase phosphatidylinositol dépendante (PDK1). Akt phosphorylé par PDK1 se dissocie de PI(3,4,5)P₃ et passe dans le cytosol. Les protéine-kinases PKA, PKB (Akt), PKC et CaM-kinases activent ensuite les protéines/gènes cibles et modifient le comportement de la cellule.

- Certains activent l'adénylate cyclase entraînant ainsi l'augmentation intracellulaire de l'AMP cyclique et l'activation de la protéine-kinase A (PKA).

- D'autres activent une phospholipase C spécifique des phosphoinositides (phospholipase C β) qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonate pour former deux médiateurs intracellulaires : l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) et le DAG.

- L'IP3 provoque une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (iCa^{2+}) par relargage du Ca^{2+} situé dans le réticulum endoplasmique (RE). L'augmentation du iCa^{2+} peut activer directement de nombreuses voies de signalisation et/ou indirectement après sa liaison avec la calmoduline activant alors des sérines/thréonine-kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes (CaM-kinases). La CaM-kinase II est une des plus importantes CaM-kinases.
- Le DAG, molécule liposoluble qui reste dans la membrane plasmique, va activer la protéine-kinase C (PKC) qui est aussi dépendante du Ca^{2+} . L'activation des protéine-kinases PKA, PKC et CaM-kinases induit la phosphorylation de protéines cibles qui vont modifier le comportement de la cellule.

2.2. La signalisation par les récepteurs couplés aux enzymes

Il existe 5 classes de récepteurs couplés aux enzymes :

- les récepteurs à activité tyrosine-kinase ;
- les récepteurs associés aux tyrosine-kinases ;
- les récepteurs à activité sérine/thréonine-kinase ;
- les récepteurs associés aux histidine-kinases et
- les guanylates cyclases transmembranaires.

● **Les récepteurs à activité tyrosine-kinase et ceux associés aux tyrosine-kinases sont les plus nombreux, regroupés en 20 sous-familles.** Ils ont de multiples ligands dont divers facteurs de croissance et hormones comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), des cellules endothéliales (VEGF), des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), des cellules épithéliales (EGF), l'insuline ou encore les facteurs de croissance de type insuline-like (IGF-1 et IGF-2). La liaison du ligand à son récepteur à activité tyrosine-kinase déclenche une autophosphorylation du récepteur sur de multiples tyrosines. Cette autophosphorylation active des kinases et recrute de nombreuses protéines de signalisation intracellulaire qui s'interagissent par des domaines spécifiques et hautement conservés (domaines SH2 ou régions d'homologie avec Src) pour transmettre le signal par de multiples voies de signalisation.

● **La protéine Ras est une GTPase monomérique qui joue un rôle majeur dans la signalisation des récepteurs à activité tyrosine-kinase.** Elle est recrutée par des protéines adaptatrices ayant des domaines SH2 et SH3. Comme toutes les protéines de liaison au GTP, l'activité de Ras dépend de sa liaison au GDP ou au GTP. Ras activée stimule une voie de signalisation hautement conservée et impliquée dans la croissance cellulaire et la réponse inflammatoire : la voie des MAP-kinases (*mitogen-activated protein kinases*) **Figure 5**. La voie de PI3K (PI3 kinase) est une autre voie de signalisation importante de survie cellulaire stimulée par Ras **Figure 4**. L'activation de Ras dépend de la protéine Sos (*son of sevenless*), un facteur d'échange des nucléotides guanyliques ou GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), qui est recrutée au récepteur à activité tyrosine-kinase par la protéine adaptatrice Grb2. Ras-GTP activé stimule la kinase Raf et la voie de MAP kinase ERK **Figure 5**.

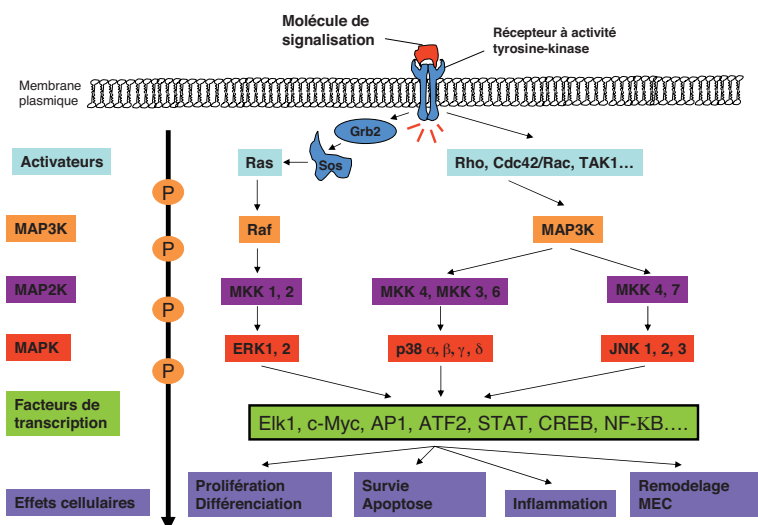


Figure 5. Voie des MAP kinases. Les voies des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) sont divisées en trois voies : ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), p38 et JNK (*C-Jun N-terminal kinases*). Ces trois protéines ont plusieurs isoformes et sont les dernières protéine-kinases des trois voies respectives. Chaque protéine-kinase est activée par des MAPK kinases (MKK ou MAP2K) spécifiques qui elles-mêmes sont activées par d'autres kinases, les MAPK kinase-kinases (MAP3K). Les MAP3K ont des activateurs spécifiques en fonction du signal extracellulaire initial et du type de cellule.

3. Les voies de signalisation intracellulaires

3.1. Les voies des MAP kinases

- **La famille des MAP kinases comporte plusieurs enzymes interactives organisées en module à trois niveaux d'activation successive** [Figure 5](#). Les trois voies principales des MAP kinases, définies par les derniers éléments de la cascade qui comportent tous plusieurs isoformes, sont les voies des kinases ERK1 et ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases*), de p38 MAP kinases (avec 4 isoformes dénommés α , β , γ et δ) et de *C-Jun N-terminal kinases* (JNK1, JNK2 et JNK3).

- **Les MAP kinases ont une expression ubiquitaire et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques.** ERK1 et ERK2 régulent habituellement la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Les MAP kinases p38 et c-JUN sont impliquées dans la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire, etc...

- **Les MAP kinases sont activées par phosphorylation par des MAP kinase-kinases (MKK ou MAP2K)** qui sont elles-mêmes stimulées par des MAP kinase-kinase-kinases (MAP3K) situées les plus en amont de la voie [Figure 5](#). Par exemple, JNK est activée principalement par deux kinases d'amont MKK4 et MKK7. JNK activé stimule le facteur de transcription c-Jun qui peut alors former le complexe de facteurs de transcription AP-1 (*transcription-factor complexe activator protein*) par homodimérisation ou hétéro dimérisation en s'associant avec un autre membre de la famille des facteurs de transcription Jun et Fos. AP-1 a une distribution ubiquitaire et régule, entre autres, l'expression de métalloprotéases (MMP), de cytokines inflammatoires. Les mêmes cascades d'activation existent pour les deux autres voies des MAPK : MEK1 et MEK2 activent ERK1 et ERK2 alors que MKK3/6 activent p38 MAP kinases. L'activation des voies MAPK est régulée étroitement (de façon temporelle et spatiale) dans chaque cellule et son inactivation dépend des sérine/thréonine-phosphatases, des tyrosine-phosphatases et des phosphatases à double spécificité (*dual specificity phosphatases DUSP*).

3.2. La voie de PI3 kinase/Akt

- **La phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) peut être activée par les récepteurs à activité tyrosine-kinase** mais aussi par d'autres types de récepteurs comme les récepteurs couplés aux protéines G. Elle est impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaires. PI3K est classée en plusieurs familles qui contiennent plusieurs isoformes. PI3K activée stimule la phosphorylation des inositol phospholipides membranaires sur la position 3 du cycle inositol et génère des lipides membranaires appelés PI(3, 4)P₂ (phosphatidylinositol 3, 4 bis-phosphate) et PI(3, 4, 5)P₃ (phosphatidylinositol -3, 4, 5 trisphosphate). Ces phospholipides membranaires sont déphosphorylés par des inositol phospholipides phosphatases (PTEN). PI(3, 4) P₂ induite par PI3K peut aussi être converti en IP₃ et DAG par une PLC γ activant ainsi les CaM-kinases.

- **L'activation de PI3K génère un signal qui recrute la protéine-kinase B (ou Akt) à la membrane cellulaire.** Celle-ci se lie alors avec la PI(3, 4, 5)P₃ et change de conformation permettant son activation par une protéine-kinase phosphatidylinositol dépendante (la PDK1). Akt activé est relâché dans le cytosol où il favorise la survie cellulaire en inhibant des protéines pro-apoptotiques et/ou la transcription des gènes qui les codent [Figure 4](#).

3.3. La voie de NF- κ B

- **Les protéines NF- κ B (dimères formés à partir de 5 protéines) ont été identifiées** il y en a une vingtaine d'années. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire, en particulier elles lient le promoteur du gène codant pour la chaîne légère kappa dans les cellules B. Ainsi, la voie de NF- κ B est une voie majeure dans l'organisme vivant. Sa délétion chez l'animal est létale. NF- κ B régule le développement, la communication intercellulaire, la réponse immunitaire innée et adaptative et la réponse inflammatoire, etc... Elle est impliquée dans les pathologies inflammatoires, les pathologies cancéreuses, l'athérosclérose ou encore le diabète.

- **La famille de NF- κ B comporte 5 membres chez les cellules de mammifères : RelA (ou p65), RelB, RelC, p50 (ou NF- κ B1) et p52 (ou NF- κ B2) qui s'associent pour former des homodimères et des hétérodimères.** Les dimères de NF- κ B sont maintenus inactifs par les protéines de la famille des inhibiteurs de NF- κ B (I κ B ou *inhibitors of NF- κ B*). Les 9 membres de la famille I κ B sont I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , p100 et p105 qui sont, respectivement, les précurseurs de p50 et p52, I κ B ζ et I κ BNS (ou I κ B δ).

- **L'activation de NF- κ B est sous le contrôle de I κ B kinase (IKK)**, complexe trimérique composé de deux sous-unités catalytiques (IKK α ou IKK1 et IKK β , ou IKK2) et de la sous-unité régulatrice NEMO (*NF- κ B essential regulator, connu aussi sous le nom d'IKK γ*) **Figure 6**. Lorsque la voie de NF- κ B est stimulée, le complexe IKK phosphoryle les protéines I κ B sur des résidus sérines et thréonines spécifiques. I κ B phosphorylé subit une ubiquitinylation puis est dégradé par le protéasome permettant ainsi aux dimères NF- κ B libres de passer dans le noyau et d'activer les gènes cibles **Figure 6**.

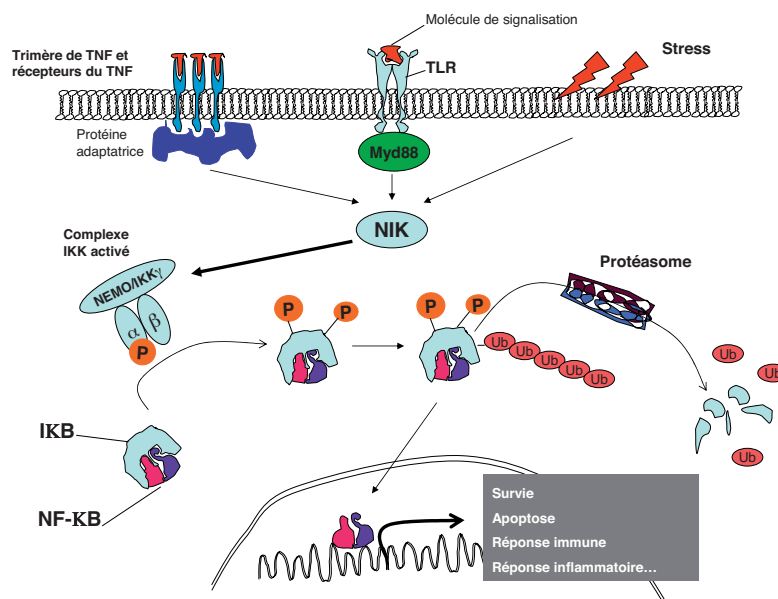


Figure 6. Voie de NF- κ B. NF- κ B est séquestré dans le cytosol par des protéines inhibitrices I κ B (*inhibitors of NF- κ B*). L'activation de la voie de NF- κ B par les récepteurs du TNF α , les récepteurs TLR (récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs IL-1 et des récepteurs Toll) ou encore un stress (rayonnement ultraviolet, ionisant, dérivés oxygénés) stimule la phosphorylation du complexe I κ B kinase-kinases (IKK) qui est un trimère associant la sous-unité régulatrice NEMO (*NF- κ B essential regulator, connu aussi sous le nom de IKK γ*) et des deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β . IKK activé induit la phosphorylation de I κ B puis son ubiquitinylation (Ub) et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de I κ B permet alors à NF- κ B de se déplacer dans le noyau et d'activer la synthèse de protéines spécifiques impliquées dans la régulation de la survie et de l'apoptose cellulaire, de la réponse immunitaire et inflammatoire etc... NIK : *NF- κ B-inducing kinases*. MyD88 : *myeloid differentiating factor 88*.

- **NF- κ B peut être activé par deux voies principales.**

La voie classique ou canonique est activée par de nombreux stimuli comme les cytokines inflammatoires, les produits bactériens ou viraux, le stress, les radicaux libres dérivés de l'oxygène, les ultraviolets et les rayonnements ionisants, etc... Ces signaux induisent la dégradation de I κ B α et l'accumulation nucléaire, essentiellement, du dimère RelA-p50 qui régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la mort cellulaire.

- La voie alternative ou non-canonique est activée par des récepteurs impliqués dans l'organogenèse des tissus lymphoïdes et le développement des lymphocytes comme le récepteur à la lymphotoxine- β , ou encore le récepteur au facteur activateur des lymphocytes B (BAFF ou *B cell-activating factor*)

3.4. La voie JAK/STAT

- **La voie JAK (*Janus kinase*) est la voie d'activation de nombreuses cytokines telles que l'interféron, l'IL-6, IL-15 et de facteurs de croissance comme l'hormone de croissance et le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*).** Les JAK (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques. Elles ont été découvertes au cours des études sur les effets des interférons. Elles régulent l'expression de gènes impliqués dans l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaires.

- **L'activation des JAK stimule la phosphorylation des protéines STAT (*signal transducers and activator of transcription*)** qui induisent alors la transcription de gènes cibles. JAK stimule aussi les voies de Ras/MAPK et de PI3K et Akt.

- **Sept protéines STATS sont actuellement identifiées.** (Elles possèdent toutes un domaine SH2 qui permet leur liaison sur la tyrosine phosphorylée du récepteur activé. Le domaine SH2 permet aussi la formation

de dimères (homodimères et hétérodimères) entre les protéines STAT activées. Les dimères activés de STAT migrent ensuite dans le noyau nucléaire pour stimuler des gènes spécifiques. La voie des STAT est souvent accompagnée d'un rétrocontrôle négatif. En effet, STAT stimule aussi la production de protéines inhibitrices telle que SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) qui va inactiver JAK et STAT5 qui par rétrocontrôle inactive la STAT phosphorylée. L'autre mécanisme de désactivation passe par les tyrosine-phosphatases. Ainsi, les JAK sont inhibés par la tyrosine-phosphatase SHP-1 **Figure 7**.

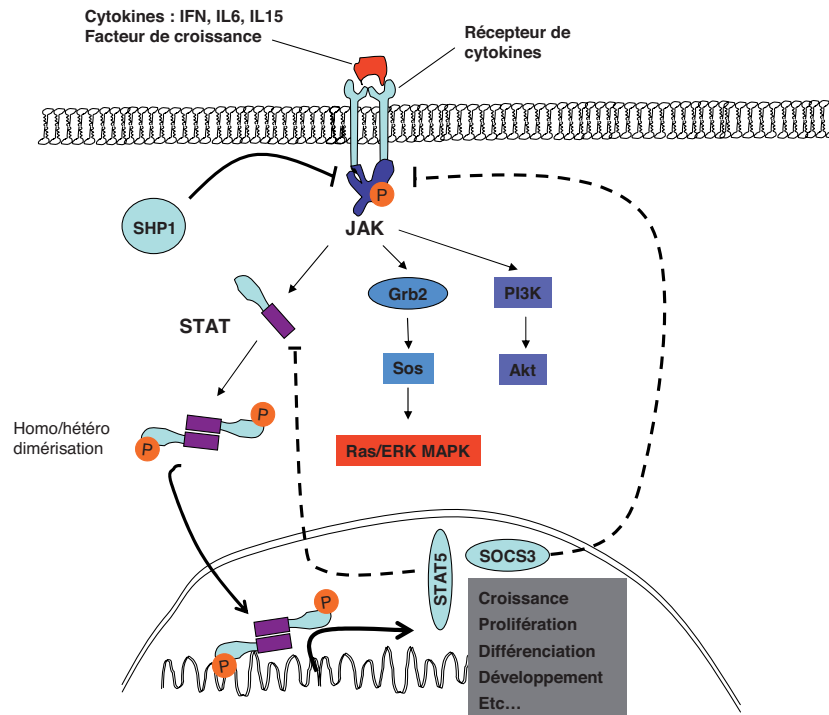


Figure 7. Voie d'activation de JAK/STAT. Janus Kinases (JAK) sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques qui peuvent être activés par les récepteurs des cytokines. JAK activé stimule la phosphorylation de STAT (*signal transducers and activator of transcription*) qui peut alors former des homo/hétérodimères. Les dimères de STAT migrent dans le noyau nucléaire et stimulent des gènes cibles à l'origine des modifications du comportement cellulaire. STAT induit aussi la production de protéines qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie de JAK comme les protéines SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) et STAT5. JAK peut être inhibé par une tyrosine-phosphatase, la SHP1. Par ailleurs, l'activation de JAK peut aussi stimuler les voies de Ras/MAPK ERK1/2 et la voie de PI3K et d'Akt.

3.5. La voie des récepteurs TLR

- La réponse immune innée est médiée par les récepteurs TLR (*toll-like receptors*) qui ont comme ligand les produits microbiens ou PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). L'activation des récepteurs TLR stimule des voies de signalisation intracellulaire qui peuvent être séparées en deux groupes : celles dépendantes de la protéine adaptatrice MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) qui déclenchent une production de cytokines pro-inflammatoires avec une activation rapide de NF-κB et des MAPK, et celles indépendantes de MyD88 associées à la production de l'interféron (IFN) β, et des gènes IFN-dépendant, et la maturation des cellules dendritiques avec une activation lente de NF-κB et des MAPK **Figure 8**.

- Il existe chez l'homme au moins 9 TLR qui s'interagissent pour former des homo- et des hétérodimères. Chaque TLR possède un répertoire particulier de PAMP comme ligand. Ainsi, TLR2 lie le peptidoglycane des parois bactériennes, TLR4 le lipopolysaccharide des bacilles Gram négatif, TLR3 et TLR7 les séquences des ARN viraux, TLR9 des séquences d'ADN contenant les CpG, etc... TLR2 et TLR4 reconnaissent aussi des microcristaux d'urate monosodique (UMS) et des cristaux de pyrophosphate de calcium (PPCD) ou encore des cristaux de phosphate de calcium. Tous les TLR et le récepteur à l'IL-1 ont en commun MyD88 comme protéine adaptatrice intracellulaire hormis l'homodimère TLR3 dont le signal est relayé par la molécule TRIF (*toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β*) **Figure 8**. L'activation de MyD88 recrute des kinases et facteurs activateurs tels que IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) et TRAF (*TNF receptor-associated factor*) qui stimulent rapidement les voies de NF-κB et des MAPK.

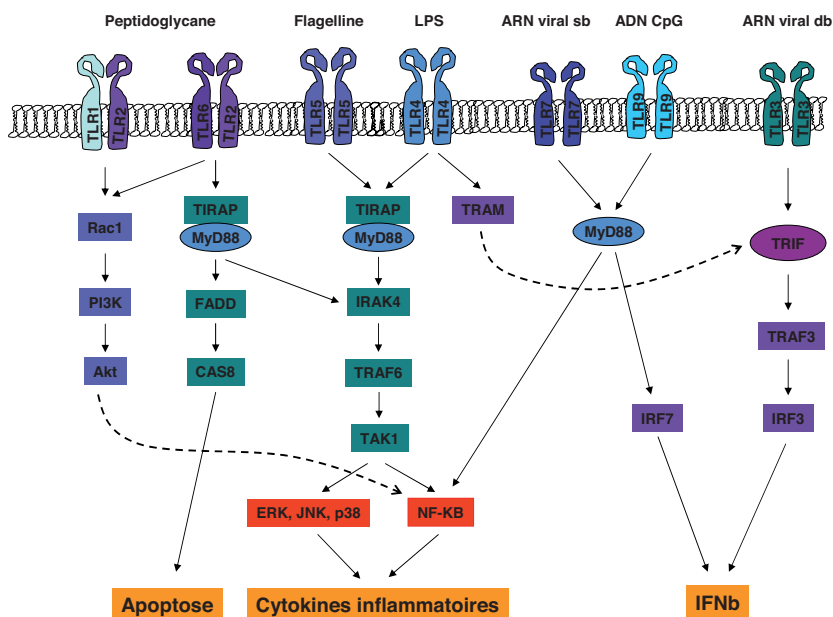


Figure 8. Voies de signalisation des récepteurs Toll-like (TLR). Les TLR homo/hétérodimères reconnaissent des ligands spécifiques issus de produits microbiens (PAMP ou *pathogen-associated molecular pattern*). L'activation des TLR stimule des voies de signalisation qui sont soit dépendante de la protéine adaptatrice MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) soit dépendante de TRIF (*toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β (IFN)*) pour l'homodimères TLR3. L'homodimère TLR4 peut activer à la fois MyD88 via la molécule adaptatrice TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*) et TRIF via la molécule TRAM (*toll-like receptor adaptor molecule 2*). L'activation de TRIF induit la phosphorylation IRF3 (*IFN regulatory factor*) qui migre dans le noyau nucléaire et induit la transcription de l'IFN, et des gènes IFN-dépendant. Pour les cellules dendritiques, l'activation des homodimères TLR7 et TLR9 induit l'activation de MyD88 puis d'IRF7 qui stimule ensuite la production de l'IFN β . L'activation de MyD88 stimule la voie de NF- κ B et les 3 voies des MAPK via les protéines IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4*), TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) et TAK1 (*TGF β -activated kinase 1*) ou MAP3K7 (*MAP kinase kinase kinase 7*). MyD88 activé par l'hétérodimère TLR2/TLR6 peut aussi se lier à FADD (*fas-associated via death domain*) et stimuler la caspase 8 (CAS8) et l'apoptose de la cellule. Enfin, l'hétérodimère TLR1/TLR2 peut induire NF- κ B via la voie de PI3K/Akt en activant Rac1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), une petite molécule monomérique GTP appartenant à la famille Rho.

3.6. La voie des récepteurs intracellulaires NOD et de l'inflammasome NLRP3

- **La reconnaissance des produits microbiens est aussi assurée par des récepteurs intracellulaires NLR (NOD-like receptors).** Les NLR détectent les PAMP et les motifs moléculaires associés aux signaux dangers (*DAMPs* ou *danger-associated molecular patterns*). Ils ont un domaine qui reconnaît des domaines riches en leucine, un domaine NOD et des motifs d'interaction protéine-protéine tels que des domaines pyrine et CARD (*caspase activation and recruitment domain*). Les effets pro-inflammatoires des NLR sont médiés par la voie de NF- κ B et l'activation de la caspase 1 par un complexe protéique appelé inflammasome **Figure 9**.

- **L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique composé d'une protéine de la famille des récepteurs NLR, de la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et de la pro-caspase-1 (Cas1).** La stimulation de NLRP3 active la Cas1 qui va induire la maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β active **Figure 9**. L'inflammasome NLRP3 ou cryopyrine contient les domaines NACHT-LRR-PYD. Le domaine LRR reconnaît les ligands, les domaines NACHT permettent l'oligomérisation et donc l'activation de NLRP3 et le domaine PYD le recrutement de protéine adaptatrice. NLRP3 peut être activé par des produits microbiens et des DAMP (cristaux d'UMS, cristaux de PPCD, dérivés oxygénés, β amyloïde, irritants dermiques, des protéines du choc thermique, les microcristaux de silice, d'asbeste, d'aluminium ou encore de cholestérol). Ces stimuli peuvent activer NLRP3 soit par une interaction avec la membrane cellulaire soit après leur phagocytose.

- **La liaison de l'ATP à son récepteur P2X7 induit un efflux de potassium qui stimule NLRP3.** Les microcristaux, après leur phagocytose, stimulent l'inflammasome par désorganisation des phagolysosomes et libération des enzymes lysosomales telle que la cathepsine B et libération des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) **Figure 9**.

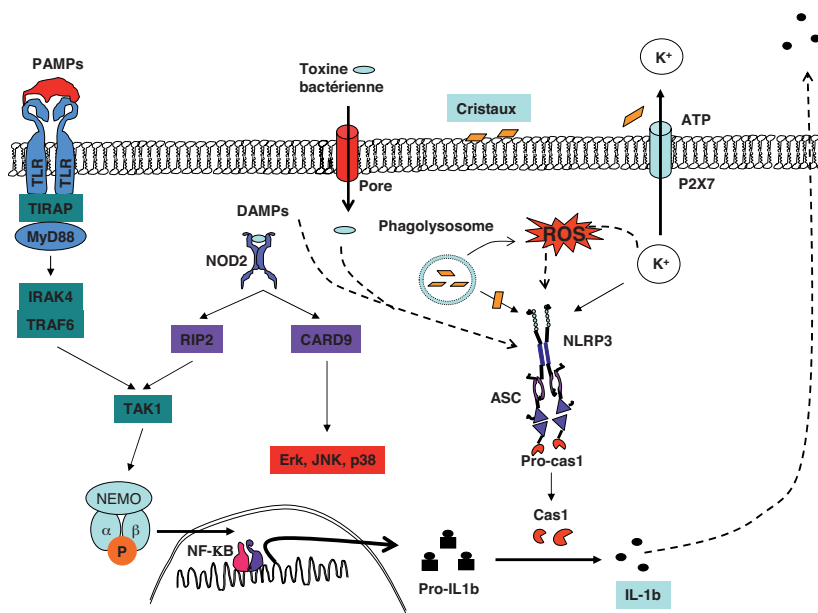


Figure 9. Activation des NOD et maturation de l'IL-1 β par l'inflammasome NLRP3. La liaison des motifs moléculaires associés au signal danger (DAMPs *danger signal molecular pattern*) à leur récepteur intracellulaire, les récepteurs NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) ou NLR, activent la voie des MAPK via la protéine CARD9 (*caspase recruitment domain family*) et la voie de NF- κ B via la protéine RIP2 (*receptor interacting serine/threonine-protein kinase*). NF- κ B peut aussi être activé par la voie des TLR stimulés par les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). La protéine NLRP3 peut être stimulée par les DAMPs, des toxines bactériennes, l'ATP via le récepteur P2X7, des structures microparticulaires, des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS), etc... L'activation de NLRP3 induit son oligomérisation, le recrutement des protéines ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et l'activation de la procaspase-1 (*pro-cas1*). Cas1 activé stimule la maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β active qui est alors sécrété.



● L'exploration des voies de signalisation n'est actuellement pas réalisable de façon routinière en pratique clinique. L'anamnèse permet d'orienter vers certaines maladies auto-inflammatoires devant l'association récidivante de fièvre, de douleur articulaire (et/ou d'arthrite) et d'éruption cutanée. Ces signes évoquent une pathologie secondaire à une mutation activatrice de la protéine NLRP3 (ou cryopyrinopathies) à l'origine d'une production accrue de l'IL-1 β . L'hypothèse diagnostique pourra être confirmée par une analyse génétique orientée.

● En recherche, toutes les étapes de la signalisation intracellulaire peuvent être étudiées, depuis la liaison du ligand à son récepteur jusqu'à la réponse cellulaire. L'exploration des voies de transduction utilisent, in vitro, des techniques de biologie cellulaire, de biologie moléculaire et de techniques d'imagerie et, in vivo, des souris invalidées. Elle est de complexité diverse. Elle est simple lorsqu'elle est basée sur la mise en évidence des phosphorylations d'une protéine spécifique, complexe lorsqu'elle évalue les interactions protéiques des différentes voies de signalisation. L'implication d'une voie de signalisation intracellulaire dans un processus biologique peut aussi se baser sur l'évaluation fonctionnelle de la réponse cellulaire (par exemple croissance cellulaire, apoptose, différenciation, migration, production d'une molécule spécifique, de cytokines etc...) en fonction de la modulation ciblée d'une protéine de signalisation. Cette modulation peut se faire par des inhibiteurs pharmacologiques, des méthodes de biologies moléculaires par ARN interférence ou encore l'utilisation de cellules isolées de souris invalidées.

1. Comment mettre en évidence une phosphorylation

La phosphorylation d'une protéine peut être détectée par des techniques immuno-empreintes (ou Western Blot), immuno-enzymatiques de type ELISA ou encore de microscopie à fluorescence.

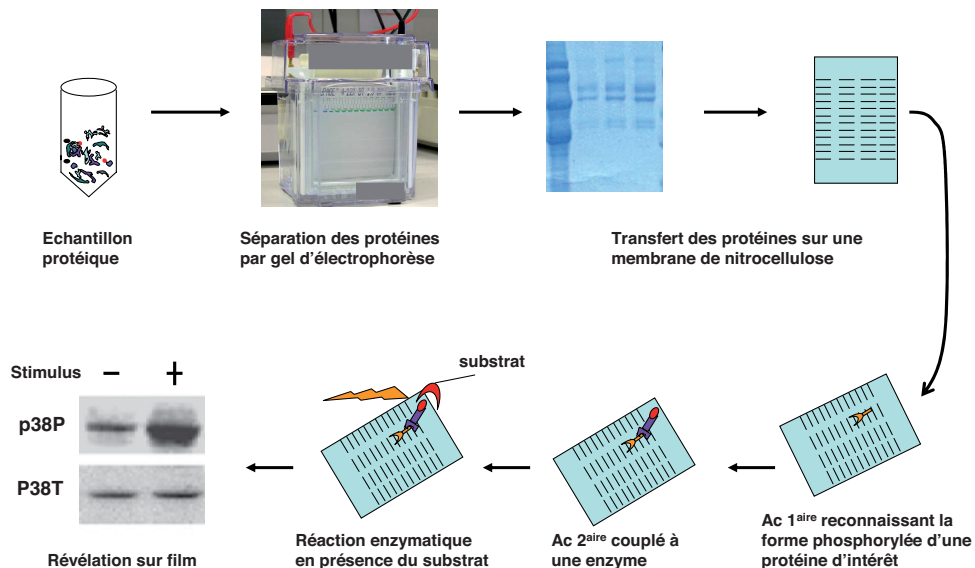


Figure 10. Etude d'une phosphorylation par Western Blot. Les protéines contenues dans l'échantillon à étudier sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, un puissant détergent qui empêche les interactions protéiques et donne aux protéines une charge négative. Le pourcentage d'acrylamide contenu dans le gel crée des mailles plus ou moins serrées. Les protéines les plus grosses sont arrêtées en haut du gel tandis que les plus petites migrent dans le fond du gel. Les protéines séparées dans le gel d'acrylamide sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un courant électrique. Après des étapes de lavage, on détecte la protéine d'intérêt grâce à des anticorps. La membrane est incubée avec un premier anticorps (ou Ac primaire) qui va se lier uniquement à la forme phosphorylée de la protéine d'intérêt. Cet Ac primaire va être reconnu par un Ac secondaire qui est couplé à une enzyme (en général une peroxydase). On détecte ensuite tous ce complexe protéique en ajoutant le substrat de l'enzyme. Lors de la réaction enzymatique, il se produit un signal chemiluminescent que l'on peut recueillir sur un film autoradiographique. L'intensité de la bande obtenue est proportionnelle à la quantité de protéine phosphorylée. On apprécie cette quantité en calculant le rapport entre la forme phosphorylée et la quantité totale de la protéine. En exemple : phosphorylation de la MAPK p38 (p38P) en présence ou non d'un stimulus. p38T = quantité totale de MAPK p38.

Quelque soit la technique utilisée, le principe est identique et se déroule en trois étapes :

- 1/ incubation de l'échantillon protéique avec un anticorps (appelé anticorps primaire) dirigé uniquement contre la forme phosphorylée de la protéine de signalisation d'intérêt (en général une kinase) ;
- 2/ incubation d'un anti-anticorps secondaire couplé soit à un fluorochrome soit à une enzyme et dirigé contre l'Ac primaire ;
- 3/ révélation de l'Ac secondaire soit par observation de la fluorescence en microscopie soit par évaluation de l'activité enzymatique en ajoutant son substrat.

La méthode d'immuno-empreinte est la plus employée **figure 10**. C'est une méthode semi-quantitative tout comme la microscopie. En revanche, l'ELISA est quantitative mais est beaucoup plus onéreuse

2. Comment mettre en évidence d'une interaction protéine-protéine

Comme nous l'avons développée dans le chapitre précédent la signalisation intracellulaire implique de nombreuses interactions moléculaires formant des complexes protéiques pouvant associer plus d'une dizaine de protéines. Il est donc primordial de mettre en évidence ces interactions pour mieux comprendre les mécanismes d'action des différentes protéines. La méthode de référence pour étudier une interaction protéine-protéine est l'immunoprécipitation des protéines. La microscopie à fluorescence avec la technique du FRET en est une autre mais elle ne permet que l'étude d'une interaction entre 2 protéines.

2.1. L'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation (IP) permet d'isoler une protéine spécifique d'un échantillon contenant beaucoup d'autres et ensuite d'identifier toutes les protéines qui lui sont liées. Elle se déroule sur trois étapes principales : **Figure 11**

- **Précipitation** : l'échantillon est incubé avec un anticorps spécifique qui est couplé à des billes (supramagnétiques ou en agar-agar). Après une étape de centrifugation, la protéine d'intérêt est ainsi « capturée ou précipitée » par l'anticorps fixé aux billes ;

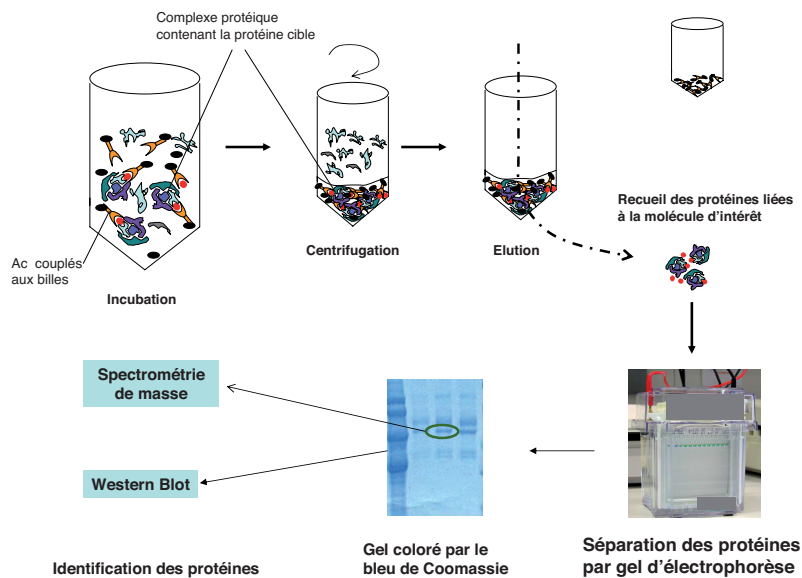


Figure 11. Etude d'une interaction protéine-protéine. L'immunoprécipitation est la technique de choix pour identifier les partenaires d'une protéine de signalisation (dénommée protéine d'intérêt). Elle se déroule en 3 étapes principales : 1/ isolement du groupement (ou complexe) protéique par incubation de l'échantillon d'étude avec un anticorps (Ac) dirigé contre la protéine d'intérêt. Les Ac sont couplés à des billes qui peuvent être supramagnétiques ou fabriquées en agar-agar. L'échantillon est centrifugé à faible vitesse pour sédimenter (ou précipiter) les billes couplés aux Ac qui ont donc lié le complexe protéique. Celui-ci est ensuite détaché (ou élué) des billes. 2/ Séparation du complexe protéique. La séparation des protéines s'effectue par électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium. La présence des protéines est révélée par une coloration au bleu de Coomassie du gel d'électrophorèse. 3/ Identification des protéines partenaires. Elle peut s'effectuer soit par spectrométrie de masse en découpant les bandes bleues visualisée sur le gel soit par Western Blot avec des Ac spécifiques.

- **Elution** : les protéines précipitées sont ensuite lavées puis détachées ou éluées des billes par des tampons spécifiques.

- **Identification des protéines isolées** : les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (détergent puissant qui permet de dissocier les interactions protéiques). L'identification des différentes protéines liées à la protéine cible peut se faire soit par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques (ce qui suppose une connaissance préalable des partenaires de la protéine étudiée) soit par séquençage par spectrométrie de masse des protéines visualisées sur le gel d'électrophorèse.

Cette technique nécessite souvent plusieurs étapes de précipitation (avec des anticorps différents) pour mettre en évidence tous les partenaires d'une protéine cible. La grande difficulté de cette méthode réside dans la disponibilité des anticorps spécifiques.

2.2. FRET ou transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

- Le FRET (*föster resonance energy transfert*) ou **transfert d'énergie entre molécules fluorescentes permet d'étudier les interactions de deux protéines en microscopie confocale**. Elle est basée sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores dont le spectre d'excitation de l'un (appelé fluorophore accepteur) est contenu dans le spectre d'émission de l'autre (appelé fluorophore donneur). Les ondes d'émission du fluorophore donneur peuvent exciter le fluorophore accepteur lorsque celui-ci est situé à une distance suffisamment proche. Le transfert d'énergie entre les deux fluorophores ou FRET est évalué par l'intensité de la fluorescence du donneur et de l'accepteur. En partant de ce principe, il est possible de montrer l'interaction entre deux protéines en marquant une protéine avec un fluorophore donneur et l'autre protéine par un fluorophore accepteur. Lors de l'interaction des deux protéines, il apparaît un FRET.

- L'analyse du FRET peut être améliorée en utilisant la méthode de photoblanchissement (*photobleaching*) qui consiste à éteindre le fluorophore par une exposition prolongée à une source lumineuse. Le photoblanchissement du donneur diminue l'intensité de sa fluorescence qui est évaluée en présence ou non de l'accepteur. Lorsque le fluorophore accepteur est suffisamment proche du donneur, il augmente la résistance du donneur au photoblanchissement. L'intensité de la fluorescence du donneur est donc plus forte et plus longue lors d'une interaction entre les deux protéines marquées **Figure 12**. Les couples de fluorophores les plus utilisés sont la fluorescéine/rhodamine ou les protéines CFP (*cyan fluorescent protein*)/YFP (*yellow fluorescent protein*).

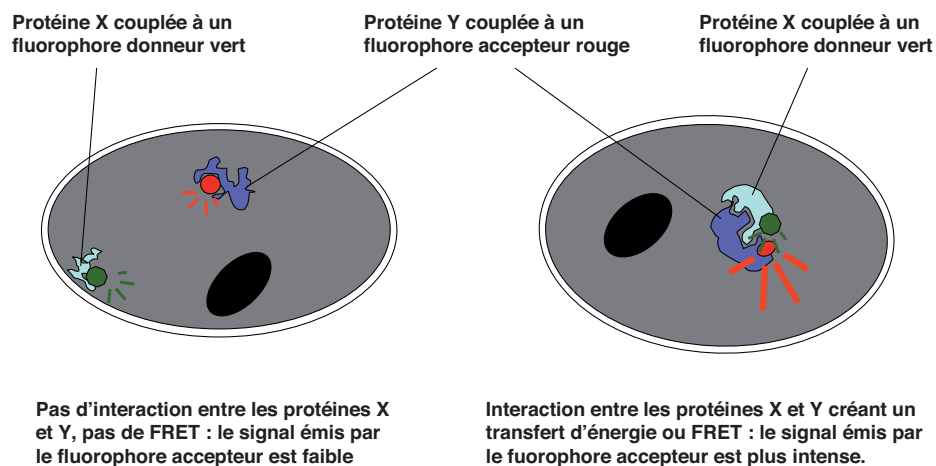


Figure 12. Principe du FRET. Le FRET (*föster resonance energy transfert*) ou transfert d'énergie entre molécules fluorescentes permet d'étudier les interactions de deux protéines en microscopie confocale. Les ondes d'émission du fluorophore donneur peuvent exciter le fluorophore accepteur lorsque celui-ci est situé à une distance suffisamment proche. Le FRET est évalué par l'intensité de la fluorescence du donneur et de l'accepteur. Pour étudier l'existence ou non d'une interaction entre deux protéines, il suffit de les marquer avec deux fluorophores dont les ondes d'émission du donneur recouvrent les ondes d'excitation de l'accepteur. Lors d'une interaction protéique le fluorophore du donneur est suffisamment proche de l'accepteur pour l'exciter. La fluorescence de l'accepteur est alors plus intense.

3. Etude fonctionnelle

L'étude fonctionnelle est une méthode globale d'évaluation des voies de signalisation. Elle consiste à évaluer la réponse cellulaire (prolifération, différenciation, apoptose, production de cytokines, de protéines matricielles etc...) à un stimulus précis en présence ou non d'une modulation d'une voie de signalisation spécifique. Cette modulation peut se faire avec des inhibiteurs pharmacologiques, par ARN interférence ou en utilisant des cellules invalidées pour la protéine de signalisation étudiée. Les tests fonctionnels peuvent être évalués de façon qualitative et/ou quantitative et par de nombreuses méthodes.

3^e partie Les voies de signalisation intracellulaire en pathologie : quelques exemples de maladies inflammatoires.

1. NF- κ B et maladies inflammatoires

■ Rôle de NF- κ B dans la « vie cellulaire »

NF- κ B occupe une place centrale dans la survie, la différenciation, l'activation et la réponse immune des cellules. Il contribue à la pathogénie des maladies auto-immunes par plusieurs mécanismes. Il est essentiel dans la survie, l'activation, la sélection et le développement des lymphocytes (B et T), la survie, le développement et la différenciation des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques (CD) et les cellules épithéliales de la médullaire thymique (mTEC) et le développement des organes lymphoïdes.

NF- κ B intervient dans la sélection négative des lymphocytes B (induction de l'apoptose et modulation de l'expression des récepteurs des cellules B (ou BCR)), la sélection positive des lymphocytes T dans le thymus, le développement des cellules « *Natural killers* » et les cellules T régulatrices (Treg). Ainsi, une baisse de la fonction ou du contrôle de NF- κ B permettrait la survie et le passage dans le sang des cellules T et B auto-réactives où elles pourraient déclencher une maladie auto-immune à la faveur d'une stimulation antigénique.

■ Conséquences expérimentales d'anomalies de NF- κ B

* L'inactivation chez la souris des membres de la famille de NF- κ B induit une altération du développement du thymus, l'absence de mTEC et de DC matures et une perte des fonctions des DC. Ces souris développent des maladies auto-immunes avec des cellules T auto-réactives, un infiltrat lymphoïde de nombreux organes et dans certains cas la mort.

* Les souris SKG qui ont été invalidées pour la protéine ZAP 70 (molécule de signalisation intracellulaire assurant la transduction du signal des récepteurs des cellules T à l'activation de NF- κ B) développent à la faveur d'un stimulus viral une arthrite auto-immune chronique qui ressemble à la polyarthrite rhumatoïde (PR) de l'homme. L'altération de la transduction du signal induit par la délétion de la protéine ZAP 70 est responsable d'une mauvaise sélection négative et positive des cellules T.

* Les souris Black New Zealand (NZB) qui développent spontanément des manifestations lupiques ont une altération de la voie de signalisation de NF- κ B, une désorganisation du thymus et une sélection thymique défectueuse.

■ Implication de NF- κ B dans les affections inflammatoires de l'homme

La PR est caractérisée par la présence dans la synoviale d'organes lymphoïdes tertiaires. La formation de ceux-ci a pu être favorisée par une altération des voies de NF- κ B. Par ailleurs, l'activation de NF- κ B favorise la formation du pannus synovial en stimulant la prolifération des synoviocytes fibroblastiques (FLS ou *fibroblast-like synoviocytes*) tout en inhibant leur apoptose via l'induction du proto-oncogène c-Myc dont l'expression est augmentée dans la synoviale de PR. Enfin, NF- κ B est activé par les cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-17 et TNF α) et médiateurs inflammatoires qui participent à la pathogénie de la PR.

2. MAPK et maladies inflammatoires

■ Rôle des MAPK dans la « vie cellulaire » et des modèles expérimentaux d'inflammation

Les voies des MAPK Erk1/2, p38 et JNK sont activées par de nombreuses cytokines dont celles impliquées dans la PR comme l'IL-1 β , IL-6, IL-17 et le TNF- α . Parmi ces trois voies, la voie de MAPK p38, en particulier de l'isoforme p38 α , est la plus impliquée dans la production de cytokines inflammatoires. L'inhibition de p38 dans les modèles murins d'arthrite diminue la sévérité des arthrites. De même, le déficit de la phosphatase-1 des MAPK exacerbe l'arthrite murine induite par le collagène.

■ Implication des MAPK dans les affections inflammatoire de l'homme

Ces trois voies sont activées dans la synoviale de PR contrairement à la synoviale de patient arthrosique. L'activation de ces MAPK prédomine dans certaines cellules de la synoviale. Ainsi, p38 est plus activé dans les cellules endothéliales et les FLS de la couche bordante, Erk1/2 dans l'infiltrat de cellules mononuclées et les FLS situés autour des microvaisseaux alors que JNK l'est plus dans l'infiltrat les cellules mononuclées. L'activation de ces voies induisent la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α , la production de protéases et de médiateurs inflammatoires. Les cytokines ont elles-mêmes une action activatrice sur ces 3 voies, créant ainsi une boucle d'amplification.

3. NOD, NLRP et maladies auto-inflammatoires.

■ Rôle des NLR dans la « vie cellulaire »

Les protéines NOD et NLRP régulent non seulement la défense anti-microbienne mais aussi la mort cellulaire et la réponse inflammatoire en modulant la voie de NF- κ B et la production de l'IL-1 β . Elles participent à l'homéostasie des organes. L'altération de ses voies de signalisation est responsable de maladies inflammatoires. Elles occupent une place centrale dans la survenue des maladies auto-inflammatoires.

■ Implication des NLR dans les affections inflammatoires de l'homme

* NOD2/CARD15 et la maladie de Crohn

Le rôle de NOD2 dans la survenue d'une maladie de Crohn est maintenant connu depuis une dizaine d'année. En effet, en 2001, deux équipes ont mis en évidence 3 polymorphismes du gène NOD2 associés à un risque accru de développer une maladie de Crohn. L'homozygotie pour ces polymorphismes était associée à un risque de développer la maladie de 20 à 40 fois supérieur par rapport au témoin. Ces polymorphismes entraînent une perte de fonction de NOD2 et une diminution de la réponse NF- κ B après une stimulation par le MDP. Les monocytes isolées des patients homozygotes produisent moins de TNF- α , d'IL-6, d'IL-8 et moins de cytokine anti-inflammatoire IL-10. Plusieurs mécanismes physiopathologiques non exclusifs sont proposés pour expliquer la survenue de la maladie de Crohn lors des mutations inactivatrices de NOD2. Ainsi, le défaut NOD2 est associé à une invasion bactérienne accrue soit par une production diminuée de la protéine α -défensine soit par une clairance défectueuse des bactéries par les macrophages intestinaux. Celle-ci serait responsable d'une activation accrue, NOD2-indépendante, des récepteurs de reconnaissance des pathogènes ou PPR (*pathogen-recognition receptors*). De même, la mutation perte de fonction de NOD2 pourrait aussi être responsable d'une activation accrue des récepteurs TLR.

* NOD2/CARD15 et le syndrome de Blau

La protéine NOD2 est aussi associée au syndrome de Blau, maladie autosomique dominante caractérisée par l'apparition d'une granulomatose précoce avec des arthrites, des uvéites et des éruptions cutanées. Les mutations de NOD2 sont associées à un gain de fonction avec une activation accrue de la voie de NF- κ B.

* NLRP3, les cryopyrinopathies et la goutte

La protéine NLRP3, molécule de signalisation de la famille des NOD et des NLR, est aussi impliquée dans de nombreuses maladies, en particulier celles associées à une production accrue l'IL-1 β . En effet, l'inflammasome NLRP3 occupe une place centrale dans la maturation de l'IL-1 β en activant la caspase-1 via son interaction avec la protéine ASC [Figure 10](#). Les mutations activatrices de NLRP3 ont, ainsi, été associées aux maladies inflammatoires héréditaires autosomiques dominantes comme le syndrome de Muckle-Wells (SMW), le syndrome d'inflammation familiale au froid (*FCAS familial cold autoinflammatory syndrome*), la maladie inflammatoire multisystémique à début néonatal (*NOMID neonatal-onset multisystem inflammatory disease*). Ces maladies auto-inflammatoires appartiennent aux cryopyrinopathies et sont caractérisées par des accès récurrents de fièvre, d'ar-

thralgies, d'éruption cutanée et de manifestations neurologiques secondaires à une production accrue d'IL-1 β . L'inhibition de l'IL-1 β (anticorps anti-IL1 (canakinumab), récepteur soluble (riloncept) ou récepteur antagoniste de l'IL-1 β (anakinra)) s'avère en général spectaculaire.

La protéine NLRP3 joue aussi un rôle central dans l'inflammation induite par des structures micro-particulaires (cf. paragraphe signalisation) dont le chef de file est les microcristaux d'urate responsable de la crise de goutte.

Ces voies de signalisation et ces molécules qui les composent apparaissent ainsi comme des acteurs majeurs de régulation de la réponse cellulaire. Leur dysfonctionnement est associé à des maladies diverses. Il est donc pertinent de considérer ces molécules comme des cibles thérapeutiques potentielles des désordres immunitaires et inflammatoires [Figure 9](#).

4^e partie Implications thérapeutiques dans la polyarthrite rhumatoïde

1. Données générales

La meilleure connaissance des perturbations des voies de signalisation au cours des maladies inflammatoires et auto-immunes a permis le développement de nouvelles classes thérapeutiques constituées de petites molécules capables de moduler l'expression des protéine-kinases impliquées dans la transduction du signal intracellulaire.

Plusieurs stratégies de contrôle de la transduction sont possibles :

- la première consiste à bloquer les voies de signalisation avec des inhibiteurs pharmacologiques,
- la seconde consiste à augmenter l'expression d'un inhibiteur naturel,
- la dernière, qui se développe rapidement, consiste à diminuer l'expression des enzymes par ARN interférence ou par d'autres méthodes.

En réalité, de nombreux traitements de fond classiques utilisés dans les maladies inflammatoires inhibent quelques unes des voies de signalisation précédemment décrites. C'est le cas de la salazopyrine, des sels d'or, du léflunomide et des glucocorticoïdes.

Ainsi, les glucocorticoïdes inhibent les voies de NF- κ B en augmentant l'expression de l'ARN messager de I κ B α et la traduction de I κ B, qui séquestrent NF- κ B dans le cytosol. La salazopyrine inhibe NF- κ B en agissant sur IKK alors que le léflunomide diminue la dégradation de I κ B. Des inhibiteurs plus spécifiques des kinases responsables de l'activation d'I κ B permettraient ainsi de bloquer efficacement l'activation de NF- κ B qui joue un rôle central dans les maladies inflammatoires et auto-immunes. L'efficacité de cette approche thérapeutique est soutenue par les résultats des études portant sur la modulation des voies de signalisation de MAPK p38 et surtout de JAK.

2. Inhibition de p38 MAPK

La voie de p38 MAPK est activée dans la PR, surtout l'isoforme p38alpha. Son inhibition diminue la production de cytokines inflammatoires et la sévérité des arthrites dans les modèles murins d'arthrite chronique (arthrite induite par le collagène, arthrite à adjuvant, arthrite par transfert de sérum). Ces résultats ont motivé la réalisation d'essais cliniques chez l'homme. A ce jour, plus de 22 inhibiteurs de p38 ont été testés dans les essais cliniques de phase I et II mais aucun n'est en phase III.

● Les inhibiteurs de p38alpha

Les nouvelles générations d'inhibiteurs sont plus sélectifs, passent moins la barrière hémato-encéphalique et sont moins toxiques (hépatique en particulier). Plusieurs de ces inhibiteurs ont été évalués dans la PR mais avec des résultats modestes. Ainsi, dans l'étude VeRA, l'administration quotidienne de l'inhibiteur de p38 VX-702 est accompagnée après 12 semaines de traitement d'une amélioration modeste

chez 44% des patients contre 33% des patients sous méthotrexate (MTX). Le résultat est aussi modeste lorsque le VX-702 est ajouté aux patients ayant une PR mal contrôlée par le MTX. De même, un autre inhibiteur très sélectif de p38 α , le RO4402257, qui a montré un effet spectaculaire dans les modèles murins d'arthrite, s'avère peu efficace chez l'homme. En effet, après 12 semaines de traitement en monothérapie, le taux de réponse ACR20 est de 23-31% pour le groupe RO4402257 contre 45% du groupe MTX. Dans une seconde étude, le RO4402257 associé au MTX ne fait pas mieux que le MTX seul. L'ensemble de ces résultats négatifs était inattendu et décevant. Plusieurs explications peuvent être avancées : dosage insuffisant en raison de la toxicité, rôle mineur de l'isoforme p38 α chez l'homme et rôle des autres isoformes, propriété anti-inflammatoire de p38 α , redondance des voies de signalisation intracellulaire permettant à la cellule de s'adapter à l'inhibition de p38 α , adaptation « physiologique » à l'inhibition de la voie p38 α et enfin divergence d'espèce motivant une interprétation prudente des résultats expérimentaux obtenus dans les modèles murins.

● L'avenir des inhibiteurs de p38alpha

L'échec de l'inhibition sélective de la voie de p38 α a plusieurs corollaires. Le premier est qu'il n'est probablement pas utile d'améliorer la spécificité de ces inhibiteurs. Le deuxième est que l'inhibition d'une molécule située en aval de p38 α n'améliorerait probablement pas l'efficacité thérapeutique. En revanche, cibler une kinase située très en amont des voies de signalisation donnerait une meilleure efficacité par le fait même qu'elle inhibe plusieurs voies. Actuellement, les petites molécules les plus efficaces dans la PR inhibent les tyrosines kinases JAK et Syk.

3. Inhibition des JAK

La voie de signalisation JAK/STAT semble constituer une cible thérapeutique plus prometteuse car cette voie est utilisée par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la PR.

● Les inhibiteurs de JAK

Dans la PR, des inhibiteurs de JAK3 (exprimés par les cellules hématopoïétiques) et des inhibiteurs de JAK1/2 ont été développés.

Dans une étude randomisée contra placebo, le CP-690,550, un inhibiteur de JAK3, est efficace dès la première semaine de traitement. Après 6 semaines de traitement, 70-80% des patients traités par CP-690,550 avaient une amélioration ACR20 contre 29% dans le groupe placebo. Près de 25% avaient une amélioration ACR70 contre 3% dans le groupe placebo. Les effets secondaires observés étaient des infections urinaires (4,4%), les diarrhées (4,0%) et les bronchites. Connell, et coll. ont rapporté au congrès de l'EULAR 2009, les résultats à 1 an de l'extension en ouvert de trois études randomisées en double aveugle du CP-690,550. Ils montrent que l'efficacité ACR20 est maintenue alors que la réponse ACR70 diminue. Il y a eu deux décès (une mort subite et un décès cardiovasculaire) sur 571 patients. Dix effets secondaires graves ont été rapportés : insuffisance rénale aiguë, diarrhée, pneumonie, tuberculose disséminée, sigmoïdite diverticulaire, herpès, staphylococcie et infection urinaire. La fréquence des effets secondaires serait identique à celle de la phase aveugle. Il existe actuellement une étude de phase III enregistrée.

Plus récemment, un inhibiteur de JAK1/2 a été évalué avec un profil d'efficacité et de tolérance comparable à l'inhibiteur de JAK3.

4. Inhibition de Syk

Syk (*spleen tyrosine kinase*) est une tyrosine kinase exprimée principalement par les cellules osseuses, les FLS et les cellules endothéliales, mais aussi les lymphocytes. Il est recruté et activé par les récepteurs ayant le domaine ITAM (*immune-receptor tyrosine based activation motif*) comme les récepteurs Fc γ R, Fc ϵ R et des intégrines. L'activation de Syk stimule plusieurs voies de signalisation telles que les voies de MAPK, de PI3K et de PLC.

● Les inhibiteurs de Syk

L'inhibition de Syk par le R788 ou fostamatinib a été étudiée récemment dans une étude de phase II, randomisée et contre placebo, chez des PR en échappement du MTX. L'efficacité est observée dès la première semaine de traitement. A 12 semaines de traitement, le taux de patients ayant un ACR20 était de

72% contre 38% dans le groupe placebo. 19% des patients avaient un ACR70. Les effets secondaires observés étaient des diarrhées, une HTA (5%) et des neutropénies (15%). La fréquence de la neutropénie était corrélée à la dose de l'inhibiteur, et observée chez 30% des patients traités par la plus forte dose. Elle était résolutive après ajustement de la posologie. En revanche, une étude de phase IIB a montré que le fostamatinib n'était pas efficace chez les patients en échappement des anti-TNF.

L'efficacité de ces deux inhibiteurs comparée à l'échec des inhibiteurs de p38 suggèrent qu'une inhibition d'une kinase située en amont des voies de signalisation est meilleure que celle d'une protéine située en fin de la voie. Cette inhibition « haute » diminuerait en effet les possibilités de compensation par la cellule. Il paraît donc préférable de cibler les voies d'amont d'activation de p38 en inhibant par exemple les MKK3 et 6 ou la kinase TAK1 **Figure 5** ou des kinases situées encore plus en amont comme TRAF, IRAK ou MyD88.

5^e partie

Points forts



- La signalisation intracellulaire permet à une cellule de répondre aux signaux provenant des autres cellules et de l'environnement. Sa régulation précise permet de maintenir un équilibre dans l'organisme et son altération est à l'origine de troubles diverses.
- Une signalisation régulée nécessite une reconnaissance précise des stimuli via des récepteurs spécifiques qui peuvent être classés en 3 familles : les récepteurs couplés aux canaux ioniques ; les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs couplés aux enzymes.
- L'activation d'un récepteur par son ligand déclenche une cascade d'événements intracellulaires et aboutit à une modification du comportement de la cellule.
- La signalisation intracellulaire peut être assimilée à un réseau informatique (ou un système d'engrenages complexes) et est constituée de multiples protéines ou molécules de signalisation qui s'interagissent et se chevauchent.
- L'activation d'une protéine de signalisation s'effectue habituellement par addition d'un groupement phosphate, le plus souvent au moyen d'une phosphorylation par une protéine-kinase qui, selon le résidu phosphorylé, est une tyrosine-kinase, une sérine-kinase ou une thréonine-kinase. Son inhibition s'effectue par soustraction du groupement phosphate par une protéine-phosphatase.
- Les voies de signalisation des MAPK, de NF- κ B, de PI3K, de JAK-STAT, des TLR et NLR constituent quelques grandes voies de transduction tout comme les voies dépendantes du calcium, de l'AMP cyclique et des PKA et PKC.
- Les voies des MAPK et de NF- κ B régulent la survie, la croissance, la différenciation et la mort cellulaires, la réponse immune et la production de cytokines inflammatoires, de protéines matricielles et de protéases.
- Ces différentes voies de signalisation sont altérées dans les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires.
- Certaines maladies auto-inflammatoires appelées cryopyrinopathies sont associées à des mutations activatrices de la protéine NLRP3 ou cryopyrine.
- La modulation de JAK ou de Syk par des inhibiteurs spécifiques améliorent la PR.

Quelques questions



- Dans un organisme pluricellulaire, la communication cellulaire assure le bon fonctionnement des différents tissus. Chaque cellule perçoit/reçoit des milliers de messages provenant des autres cellules et de l'environnement. Comment la cellule fait-elle pour filtrer ces signaux pour engendrer une réponse spécifique ?
- Les voies de signalisation intracellulaire sont multiples, s'interagissent et se chevauchent. Comment s'organisent ces différentes voies pour un stimulus donné ?
- Les principales voies de signalisation sont altérées au cours des maladies inflammatoires. Existe-t-il une voie prédominante dans le déclenchement d'une maladie inflammatoire/auto-immune précise ?
- La mutation activatrice de la protéine NLRP3 est associée aux maladies auto-inflammatoires. Pourquoi ces mutations qui ont toutes pour conséquence une production accrue de l'IL-1 β , sont-elles responsables de manifestations aussi différentes ?
- La voie de la MAPK p38 est impliquée dans la PR et les modèles murins d'arthrite chronique. Pourquoi l'inhibition de p38 reste inefficace chez l'homme alors qu'elle l'est dans les modèles murins ?
- Comment moduler de façon cellule spécifique une voie/une molécule de signalisation ?

6^e partie

Lexique



I**NFLAMMASOME** : complexe protéique intra-cytoplasmique assurant l'activation d'une enzyme, la caspase-1, à l'origine du clivage de plusieurs cytokines de la famille de l'IL-1, IL-1 β , et IL-18.

A**K** : voie JAK (*janus kinase*) qui est la voie d'activation de nombreuses cytokines telles que l'interféron, l'IL-6, IL-15 et de facteurs de croissance comme l'hormone de croissance et le GM-CSF.

K**INASES** : enzymes assurant la phosphorylation d'une protéine de signalisation.

M**APK** : famille de kinases ou *mitogen-activated protein kinases*.

N**F- κ B** : protéines NF- κ B (dimères formés à partir de 5 protéines) identifiées comme des facteurs de transcription qui lient le promoteur du gène codant pour la chaîne légère kappa dans les cellules B. C'est une des voies de signalisation principale de l'inflammation.

N**LR** : *NOD-like receptors*, ensemble de récepteurs intracellulaires qui interviennent comme les TLR dans la réponse immunitaire innée. Ils assurent un deuxième niveau de contrôle cellulaire en reconnaissent les PAMP qui ont traversé la membrane cellulaire sans se lier à un récepteur membranaire. Ils reconnaissent aussi les signaux dangers intracellulaires ou les motifs moléculaires associés aux signaux dangers (DAMP *danger-associated molecular patterns*).

P**HOSPHATASES** : enzymes assurant la dé-phosphorylation d'une protéine de signalisation.

R**écepteurs couplés aux protéines G** : récepteurs cellulaires de surface, composés de 7 domaines trans-membranaires. Ils forment la plus grande famille des récepteurs cellulaires de surface. Lorsqu'ils sont activés, ils

subissent une modification de conformation et activent les protéines G.

TLR: récepteurs (*toll-like receptors*) qui ont comme ligand les produits microbiens ou PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*).

7^e partie Pour en savoir plus



- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141:1117-34.
- <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html#cellular>.
- Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429:403-17.
- Kholodenko BN, Hancock JF, Kolch W. Signalling ballet in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:414-26.
- Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2009 ;9:778-88.
- Scott JD, Pawson T. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science*. 2009;326:1220-4.
- Pawson CT, Scott JD. Signal integration through blending, bolstering and bifurcating of intracellular information. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17:653-8.
- Sweeney SE, Firestein GS. Primer : signal transduction in rheumatic disease, a clinician guide. *Nat Clin Pract Rheum* 2007;3: 651-60.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immun* 2010;11:373-84.
- Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors : role in innate immunity and inflammatory disease. *Ann Rev Pathol Mech Dis* 2009 ;4 :365-98.
- Hammaker D, Firestein GS. « Go upstream; young man?»: lessons learned from de p38 saga. *Ann Rheum Dis* 2010;69:i72-i82.
- Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, Grossbard E Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2008;58:3309-18.
- Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D, Krishnaswami S, Burgos-Vargas R, Wilkinson B, Zerbini CA, Zwillich SH. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1895-905.
- Cohen S, Zwillich SH, Chow V, LaBadie RR, Wilkinson B. Co-administration of the JAK inhibitor CP-690,550 and methotrexate is well tolerated in patients with rheumatoid arthritis without need for dose adjustment. *Br J Clin Pharmacol* 2010;69:143-151.
- Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Maligavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2010 ;1-10.
- Mesa RA. Ruxolitinib, a selective JAK1 and JAK2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis. *Drugs* 2010;13:394-403.
- Coombs JH, Bloom BJ, Breedveld FC, Fletcher MP, Gruben D, Kremer JM, Burgos-Vargas R, Wilkinson B, Zerbini CA, Zwillich SH. Improved pain, physical functioning and health status in patients with rheumatoid arthritis treated with CP-690,550, an orally active Janus kinase (JAK) inhibitor : results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2010;69:413-6.
- Riese RJ, Krishnaswami S, Kremer J. Inhibition of JAK kinases in patients with rheumatoid arthritis : scientific rationale and clinical outcomes. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2010;24:513-526.