

Les récepteurs *toll-like*, l'interleukine 1 et le NFκB

1. Introduction

Les récepteurs *toll-like* (TLR) constituent une famille de récepteurs impliqués dans les phénomènes d'immunité et d'inflammation, qui reconnaissent des facteurs dérivés d'agents infectieux (bactéries, virus) et des substances endogènes. Ils sont étudiés ici avec les récepteurs de l'interleukine 1 (IL1) et des interleukines de la même famille, IL18, IL33 et quelques autres. L'activation de ces récepteurs aboutit, après diverses étapes impliquant des kinases cytoplasmiques, à l'activation de facteurs de transcription, en particulier NFκB (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) qui permet la mise en oeuvre de la réponse inflammatoire. Bien que NFκB puisse être activé en réponse à d'autres signaux, en particulier par AKT dans la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), nous l'étudierons dans ce chapitre. Les signaux générés par l'activation des récepteurs TLR/IL1R ont des effets sur la survie et sur la prolifération cellulaires : c'est la raison pour laquelle les voies qui aboutissent à ces signaux peuvent être détournées lors de l'oncogenèse.

Le système immunitaire contient deux types de récepteurs capables de reconnaître les composants bactériens ou viraux, que l'on appelle *Pattern-recognition receptors* (PRR) : les récepteurs membranaires *toll-like* et des récepteurs intracellulaires appelés NLR (*NOD-like receptors*, NOD signifiant *Nucleotide binding and oligomerization domain*). L'activation de ces NLR active à son tour les interleukines de la famille de l'IL1 qui, une fois sécrétées, entraîneront une réponse inflammatoire en reconnaissant les cellules équipées en récepteurs correspondants.

Les cytokines de cette famille se distinguent des cytokines étudiées dans le chapitre 4, tant par leur structure que par la signalisation induite. La famille de l'IL1 comprend une dizaine de membres répartis en quatre groupes. On distingue, dans le groupe IL1, les isoformes IL1α et IL1β, ainsi que l'IL1RA (*IL1 receptor antagonist*) qui ne peut activer la voie de signalisation en aval et est en fait un inhibiteur de cette voie

1. Définition du récepteur TLR

Les récepteurs de type Toll (TLR) sont une classe de protéines qui jouent un rôle clé dans l'immunité innée. Il s'agit de récepteurs transmembranaires à domaine unique appartenant aux récepteurs de reconnaissance des formes (PRR) qui sont généralement exprimés dans les cellules sentinelles telles que les macrophages, les cellules dendritiques et de nombreuses

autres cellules non immunitaires comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. Ils reconnaissent des molécules à structure conservée provenant de microbes, appelées motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), ou des molécules dérivées de cellules endommagées, appelées motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Les PAMPs comprennent divers composants de la paroi cellulaire bactérienne tels que le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane (PGN) et les lipopeptides, ainsi que la flagelline, l'ADN bactérien et l'ARN double brin viral. Les DAMP comprennent des protéines intracellulaires telles que les protéines de choc thermique ainsi que des fragments de protéines de la matrice extracellulaire. Les PRR activent des voies de signalisation en aval qui conduisent à l'induction de réponses immunitaires innées par la production de cytokines inflammatoires, d'interféron de type I (IFN) et d'autres médiateurs. Ces processus déclenchent non seulement des réponses défensives immédiates de l'hôte telles que l'inflammation, mais amorcent et orchestrent également des réponses immunitaires adaptatives spécifiques de l'antigène. Ces réponses sont essentielles pour l'élimination des microbes infectants et cruciales pour l'instruction consécutive des réponses immunitaires adaptatives spécifiques de l'antigène.

Les récepteurs *toll-like* et leurs ligands

Les récepteurs *toll-like* ont été découverts d'abord chez la drosophile, puis recherchés et identifiés chez les mammifères. Ils sont caractérisés par la présence de domaines intracytoplasmiques homologues de ceux des récepteurs de l'IL1, mais leurs domaines extracellulaires sont très différents : ils présentent des domaines riches en leucine et pas de domaines *immunoglobulin-like*. Les voies de signalisation en aval des récepteurs se sont également révélées communes. Il existe un total de neuf TLR, dont cinq sont présents au niveau de la membrane plasmique et quatre au niveau de membranes endosomales

La famille des TLR comprend 10 membres (TLR1-TLR10) chez l'homme et 12 (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) chez la souris. Les TLR se localisent à la surface des cellules ou dans des compartiments intracellulaires tels que le RE, l'endosome et le lysosome. Les TLR de surface cellulaire comprennent TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10, tandis que les TLR intracellulaires sont localisés dans l'endosome et comprennent TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 et TLR13 (Figure 1). Les TLR de la surface cellulaire reconnaissent principalement les composants de la membrane microbienne tels que les lipides, les lipoprotéines et les protéines. Les TLR intracellulaires reconnaissent les acides nucléiques

dérivés des bactéries et des virus, et reconnaissent également les acides auto-nucléiques dans des conditions pathologiques telles que l'auto-immunité.

La fonction des récepteurs de type Toll repose généralement sur un processus de dimérisation de deux molécules TLR, mais pas toujours. Par exemple, TLR-1 et TLR-2 se lient l'un à l'autre pour former un dimère lors de la reconnaissance de molécules PAMPs comprenant principalement des lipoprotéines, des peptidoglycanes, des acides lipotéchoïques (LTA, Gram-), du zymosan, du mannane et de la tGPI-mucine. TLR-2 peut également former un gradateur avec TLR-6 lorsqu'ils reconnaissent les mêmes PAMPs listés ci-dessus. TLR-4 peut reconnaître le lipopolysaccharide (LPS, Gram+) et former un homodimère avec une autre

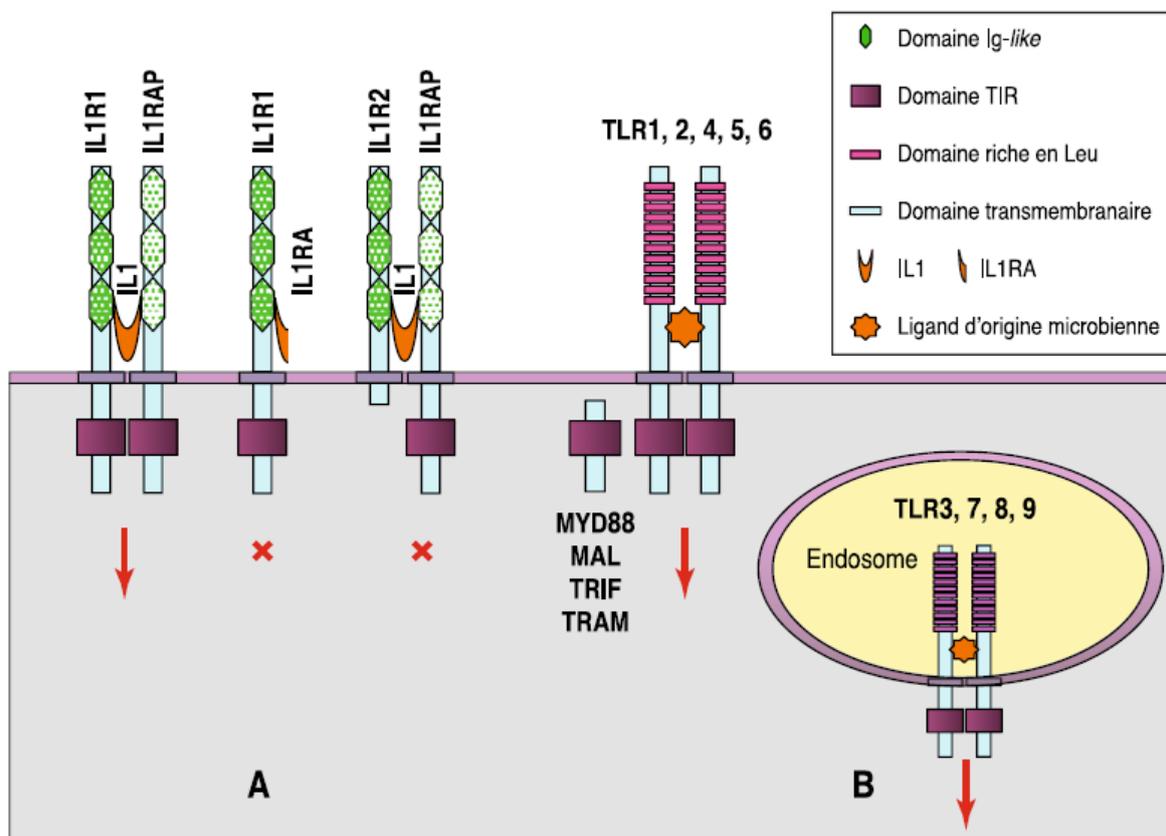


Fig.1 – Les récepteurs de l'interleukine 1 et les récepteurs toll-like.

A. Les récepteurs de l'interleukine 1 (IL1R) transmettent un signal (flèche rouge) lorsque l'IL1 est fixée sur un complexe IL1R1-IL1RAP (IL1 receptor accessory protein). L'IL1RA (IL1 receptor antagonist) ne peut transmettre de signal. La fixation de l'IL1 sur un complexe IL1R2-IL1RAP ne peut transmettre de signal.

B. Les récepteurs toll-like sont localisés sur la membrane plasmique ou au niveau des endosomes. Ils induisent un signal lorsqu'ils sont homodimérisés, parfois hétérodimérisés (TLR1 amille des récepteurs de type Toll

molécule TLR-4. TLR-5 peut reconnaître la flagelline bactérienne, mais ils ne forment pas de dimère. TLR-11 est fonctionnel chez la souris et reconnaît principalement les bactéries uropathogènes. TLR-3, 7, 8, 9, 13 sont exprimés à la surface des endosomes dans le cytoplasme. TLR3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb) viral, les petits ARN interférents et les auto-ARN dérivés de cellules endommagées. TLR-7 est principalement exprimé dans les CD plasmacytoïdes (CDP) et reconnaît l'ARN simple brin (ss) des virus. Il reconnaît également l'ARN de la bactérie streptococcus B dans les CD conventionnelles (CDC). TLR8 répond à l'ARN viral et bactérien. TLR-9 reconnaît l'ADN bactérien et viral qui est riche en motifs CpG-ADN non méthylés. TLR13 reconnaît l'ARNr 23S bactérien et des composants inconnus du virus de la stomatite vésiculaire.

2. Voie de signalisation des récepteurs de type Toll

2.1. Cascade de signalisation des récepteurs Toll-like

Les récepteurs Toll-like permettent aux cellules sentinelles telles que les macrophages de détecter les microbes par le biais de PAMPs tels que le LPS. Le LPS est un composant de la paroi cellulaire des bactéries. Le mécanisme de reconnaissance des lipopolysaccharides par les récepteurs Toll-like est complexe et nécessite plusieurs protéines accessoires. Une protéine sérique, la protéine de liaison au LPS, lie les monomères de LPS et les transfère à une protéine appelée CD14. La CD14 peut être soluble ou se lier à la surface cellulaire par l'intermédiaire d'une ancre glycosylphosphatidylinositol. CD14 délivre et charge les LPS au domaine extracellulaire des récepteurs de type Toll. Les TLR sont capables de détecter les LPS à l'aide d'une protéine auxiliaire appelée MD-2. Ensuite, l'homodimérisation des TLR est induite lorsque les LPS se lient au complexe TLR-CD14-MD2. Le changement de conformation des domaines extracellulaires initie la dimérisation du domaine cytoplasmique du récepteur Toll de l'IL-1 (TIR). Le changement de conformation du TIR fournit un nouvel échafaudage qui permet le recrutement de protéines adaptatrices pour former un complexe de signalisation post-récepteur. Le TIR contient une protéine adaptatrice, la protéine 88 de réponse primaire à la différenciation myéloïde (MyD88).

MyD88 fonctionne comme un adaptateur reliant les TLRs/IL-1Rs aux molécules de signalisation en aval qui ont des DDs. Elle reconnaît le changement de conformation du domaine TIR des TLR, se lie au nouveau complexe de récepteurs et transfère la signalisation par l'interaction du domaine de mort amino (N)-terminal (DD) avec les kinases associées à IL-1R (IRAK). Il en résulte une cascade complexe de signalisation qui avertit la cellule de l'invasion d'un agent pathogène. Il existe 4 IRAKs (IRAK 1, 2, 4, M). Ils contiennent un DD N-terminal et un domaine central sérine/thréonine-kinase. IRAK1 et IRAK4 ont une activité kinase intrinsèque, tandis que IRAK2 et IRAK-M n'ont aucune activité kinase détectable. IRAK4 est activé par MyD88 et il continue à activer IRAK1. IRAK1 active ensuite TRAF6 en aval. TRAF6 est un membre de la famille des facteurs associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) (TRAF) qui médient les voies de signalisation des cytokines. Lors d'une stimulation, TRAF6 est recruté dans le complexe récepteur et activé par IRAK-1 qui se lie au domaine TRAF de TRAF6. Ensuite, le complexe IRAK-1/TRAF6 se dissocie du récepteur et s'associe à la kinase 1 activée par le TGF-beta (TAK1) et aux protéines de liaison à TAK1, TAB1 et TAB2. Le complexe TRAF6, TAK1, TAB1 et TAB2 se déplace dans le cytoplasme, où il forme un grand complexe avec d'autres protéines, telles que les ligases E2 Ubc13 et Uev1A

Ces voies de signalisation décrites ci-dessus sont appelées voies dépendantes de MyD88 car le signal part de la molécule MyD88. Il existe également une autre voie appelée voie indépendante de MyD88, dans laquelle le signal ne part pas de MyD88. Au lieu de cela, le signal part de la protéine TRIF. TRIF interagit avec TRAF6 et TRAF3. TRAF6 recrute la kinase RIP-1, qui à son tour interagit avec le complexe TAK1 et l'active, ce qui entraîne l'activation de NF- κ B et de MAPK et l'induction de cytokines inflammatoires. En revanche, TRAF3 recrute les kinases liées à IKKTBK1 et IKKi ainsi que NEMO pour la phosphorylation et l'activation d'IRF3. IRF3 forme un dimère et se transloque du cytoplasme au noyau, induit l'expression de l'IFN de type 1.

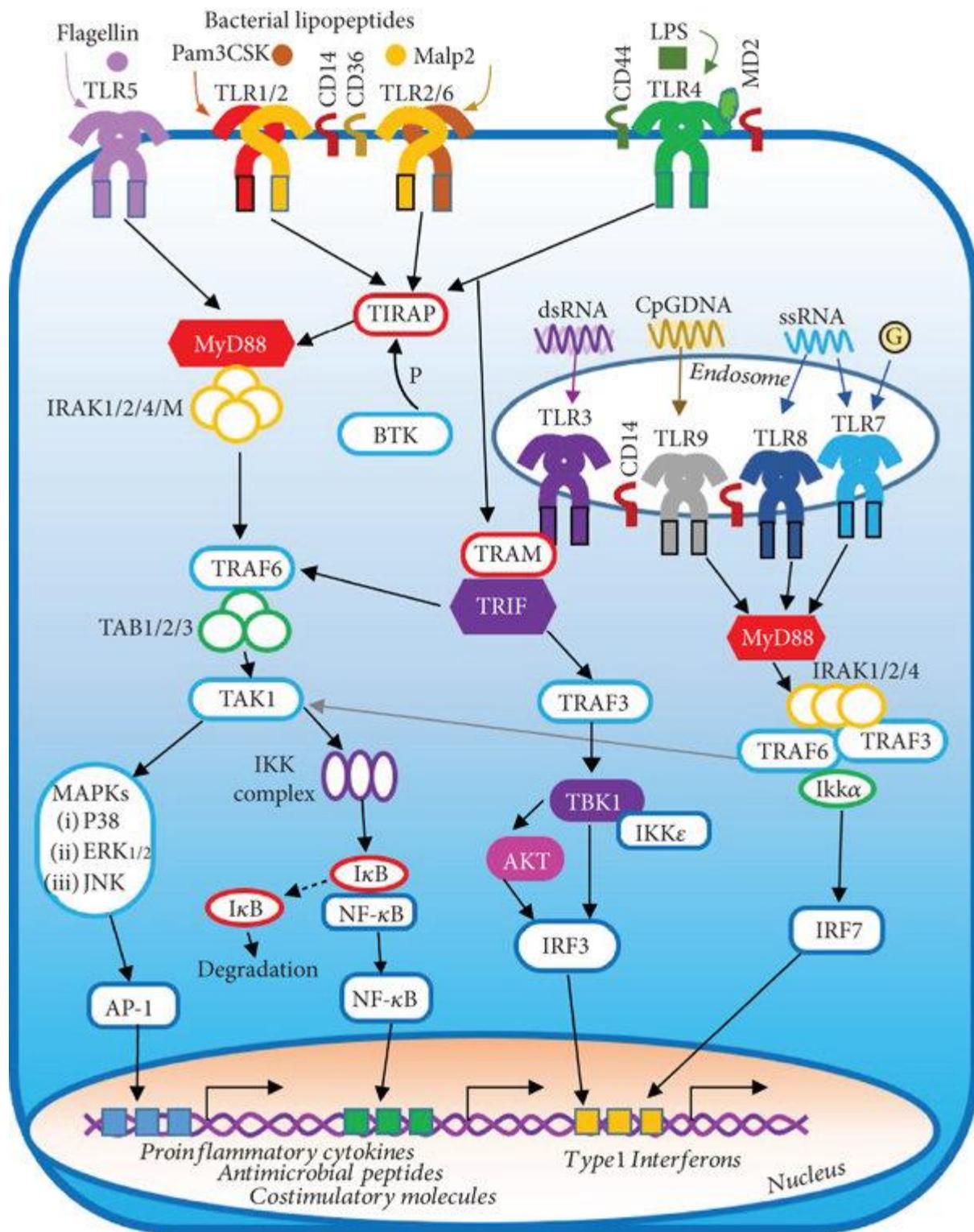


Fig2. Les voies de signalisation du récepteur TLR

a. La voie dépendante de MyD88

Après l'engagement du TLR, MyD88 forme un complexe avec les membres de la famille des kinases IRAK, appelé Myddosome . Pendant la formation du Myddosome, IRAK4 active IRAK1, qui est ensuite autophosphorylé sur plusieurs sites et libéré de MyD88. IRAK1 s'associe à l'ubiquitine ligase E3 à domaine RING TRAF6. TRAF6, ainsi que l'enzyme conjuguée à l'ubiquitine UBC13 et UEV1A, favorise la polyubiquitination liée à K63 de TRAF6 lui-même et du complexe de la protéine kinase TAK1. TAK1 est un membre de la famille MAPKKK et forme un complexe avec les sous-unités régulatrices TAB1, TAB2 et TAB3, qui interagissent avec les chaînes de polyubiquitine générées par TRAF6 pour conduire l'activation de TAK1 . Bien que les mécanismes d'activation de TAK1 au sein de ce complexe ne soient pas clairs, l'ubiquitination liée à K63 ou la transphosphorylation dépendant de la proximité peuvent être responsables de l'activation de TAK1. TAK1 active ensuite deux voies différentes qui conduisent à l'activation du complexe IKK - la voie NF- κ B et la voie -MAPK. Le complexe IKK est composé des sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et de la sous-unité régulatrice NEMO (également appelée IKK γ). TAK1 se lie au complexe IKK par l'intermédiaire de chaînes d'ubiquitine, ce qui lui permet de phosphoryler et d'activer IKK β . Le complexe IKK phosphoryle la protéine inhibitrice du NF- κ B, I κ B α , qui subit une dégradation par le protéasome, permettant au NF- κ B de se transloquer dans le noyau pour induire l'expression de gènes pro-inflammatoires. L'activation de TAK1 entraîne également l'activation des membres de la famille MAPK tels que ERK1/2, p38 et JNK, qui médient l'activation des facteurs de transcription de la famille AP-1 ou la stabilisation de l'ARNm pour réguler les réponses inflammatoires

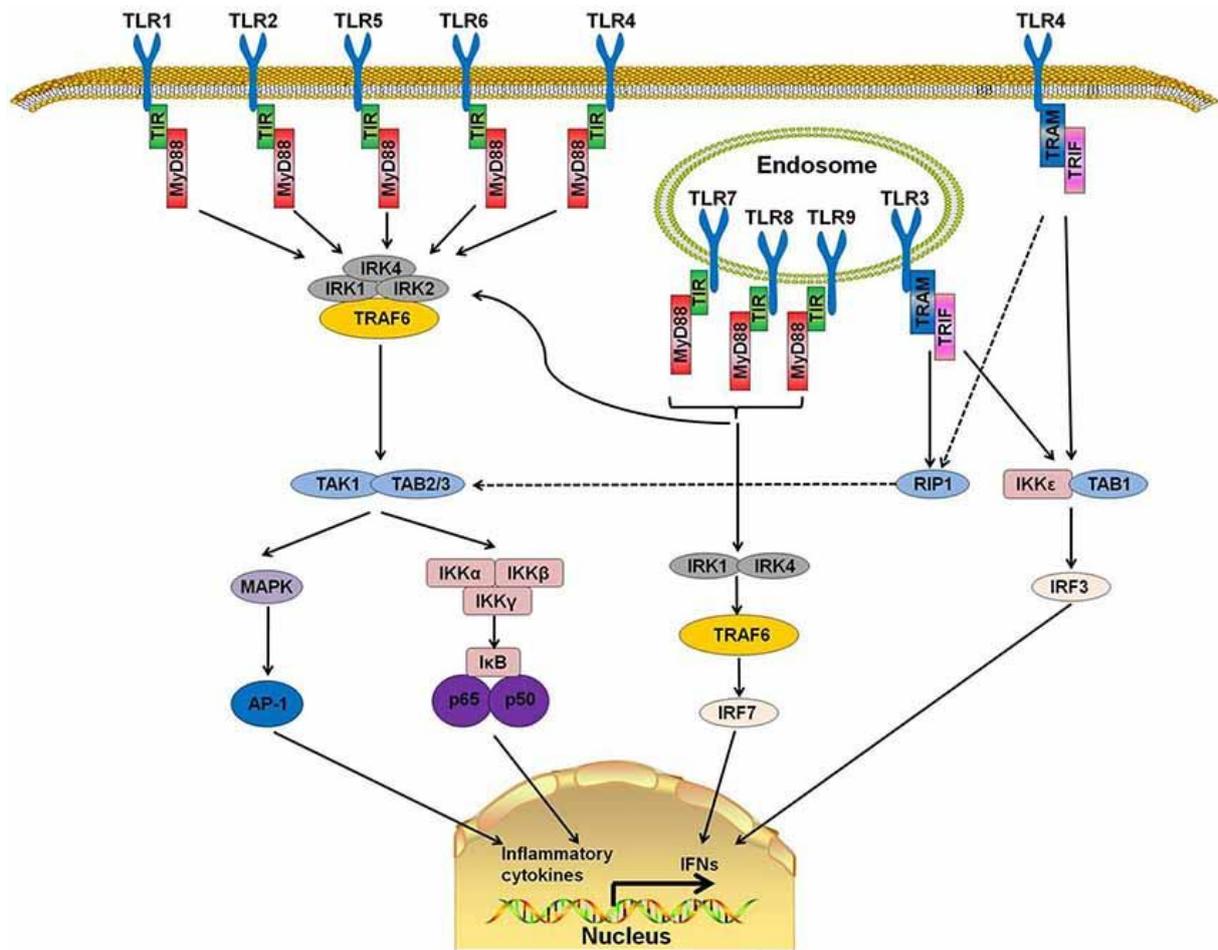


Fig 3. La voie MyD88

b. Voie dépendante de TRIF

TRIF interagit avec TRAF6 et TRAF3. TRAF6 recrute la kinase RIP-1, qui interagit à son tour avec le complexe TAK1 et l'active, ce qui entraîne l'activation de NF- κ B et de MAPK et l'induction de cytokines inflammatoires (Figure 1). En revanche, TRAF3 recrute les kinases TBK1 et IKKi liées à IKK ainsi que NEMO pour la phosphorylation d'IRF3. Par la suite, IRF3 forme un dimère et se transloque du cytoplasme vers le noyau, où il induit l'expression des gènes IFN de type I.

Activation équilibrée entre les voies dépendantes de MyD88 et de TRIF

TLR4 active à la fois les voies MyD88-dépendantes et TRIF-dépendantes. L'activation de ces voies est contrôlée par plusieurs molécules pour induire des réponses appropriées. Une production équilibrée de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I peut être importante pour contrôler la croissance des cellules tumorales et les maladies auto-immunes.

Les molécules du CMH de classe II qui sont localisées dans les endosomes des cellules présentatrices d'antigènes interagissent avec la tyrosine kinase Btk via la molécule costimulatrice CD40 et maintiennent l'activation de Btk. La Btk activée interagit avec MyD88 et TRIF pour favoriser l'activation des voies MyD88-dépendantes et TRIF-dépendantes et ainsi augmenter la production de cytokines inflammatoires et d'IFNs de type I, respectivement

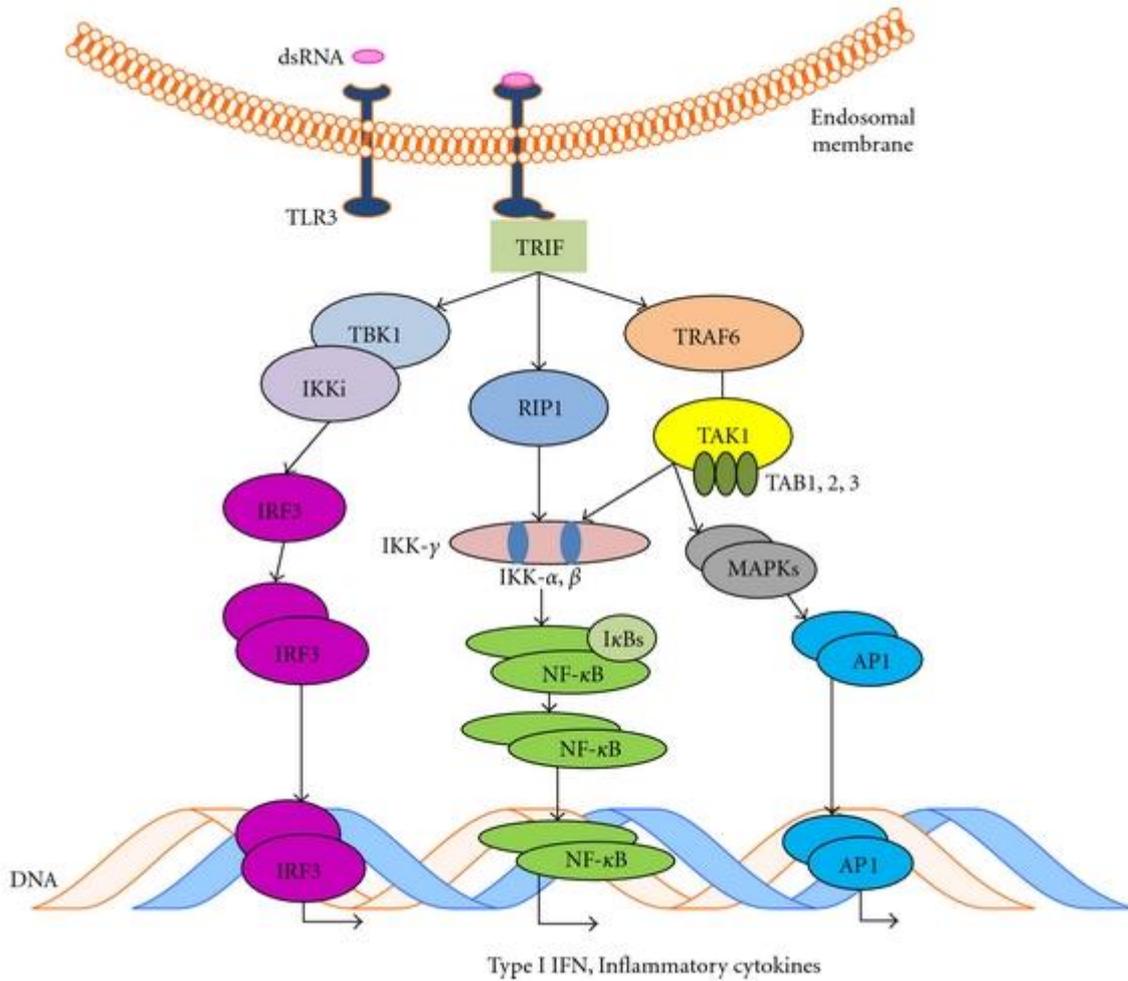


Fig 4. La voie TRIF

2. Signalisation en aval

La signalisation des TLR passe en fait principalement par le recrutement de molécules adaptatrices spécifiques, conduisant à l'activation des facteurs de transcription NF-kB et IRFs, qui dictent l'issue des réponses immunitaires innées. Cette voie de signalisation en aval consiste donc à activer le facteur de transcription IRFs, la voie de signalisation NF-kB et la

voie MAKP. Vous trouverez des informations plus détaillées sur les voies NF- κ B et MAKP dans les documents suivants :

Voie de signalisation NF- κ B, Voie de signalisation P38 et Voie de signalisation MAKP.

3. **Relation avec les maladies**

Comme les TLR sont impliqués dans la détection des LPS et qu'ils pourraient jouer un rôle dans la septicémie, le ciblage des TLR est important pour le traitement de plusieurs maladies. Outre l'interférence avec les réponses TLR pour traiter les infections par des agents pathogènes, une application clinique évidente des connaissances acquises grâce aux études sur les TLR a été d'utiliser les ligands des TLR comme adjuvants de vaccins. En outre, l'inhibition des TLR a également été tentée en clinique, l'objectif étant de limiter l'inflammation excessive qui est vraisemblablement due à l'activation excessive d'un TLR particulier.

4. **La Voie du NF κ B**

4.1. Définition

NF- κ B est le nom court de Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. Il ne s'agit pas d'une protéine unique, mais d'une petite famille de facteurs de transcription inductibles qui jouent un rôle important dans presque toutes les cellules de mammifères. Il contrôle la transcription de l'ADN, la production de cytokines, la survie cellulaire et d'autres événements cellulaires importants, et joue notamment un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire à l'infection.

Les molécules NF- κ B sont généralement des dimères. Une structure typique du NF- κ B est le dimère P50-P65 (NF- κ B1/RelA). La formation du dimère est nécessaire pour la liaison à l'ADN, deux monomères NF- κ B se lient à l'ADN sous forme de dimère. Les régions N-terminales du dimère sont responsables du contact spécifique avec l'ADN. Les régions C-terminales sont généralement très conservées, elles sont responsables de la dimérisation et du contact non spécifique avec les phosphates d'ADN. L'ensemble du NF- κ B moléculaire est comme un étau à pinces sur la chaîne d'ADN et fonctionne comme un facteur de transcription (figure 5).

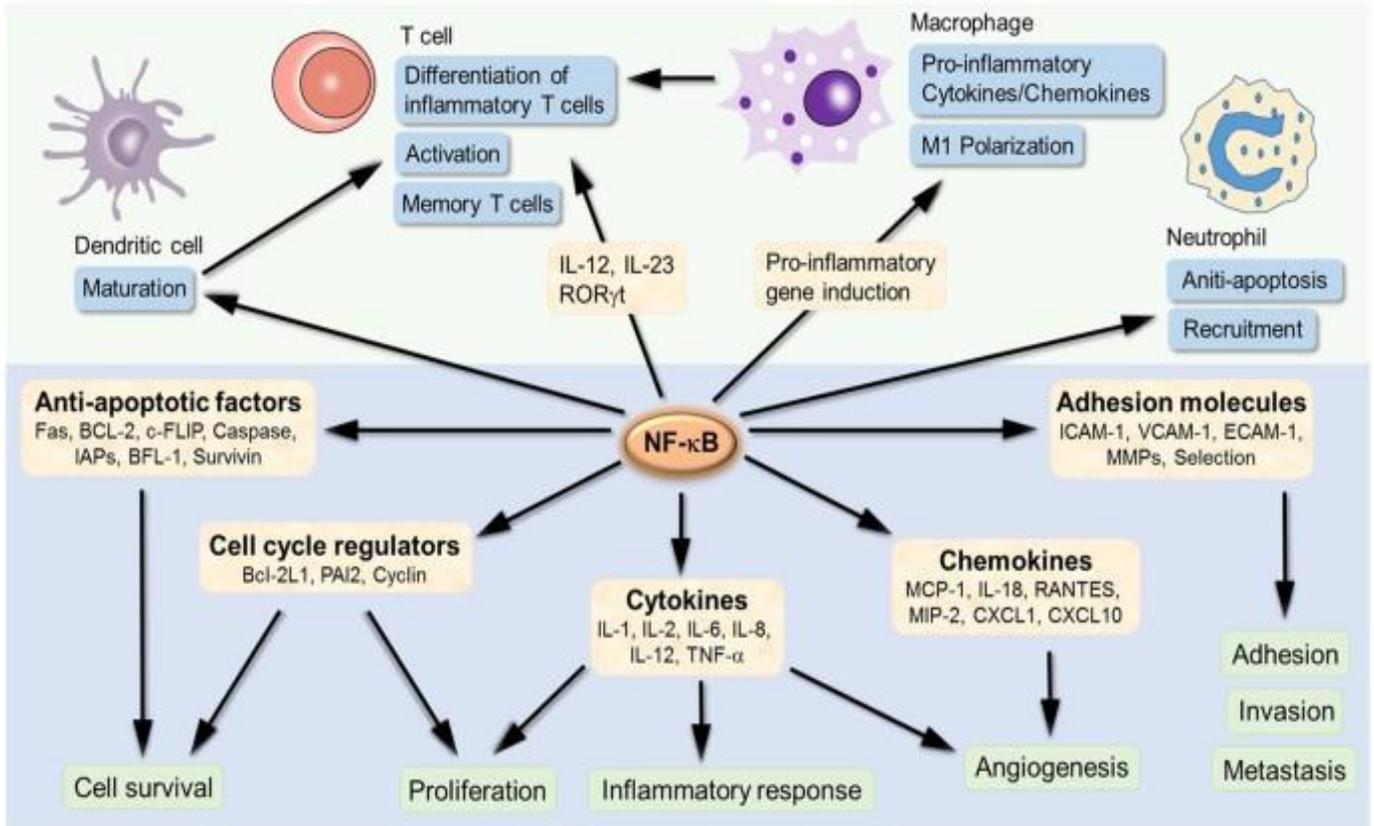


Fig 5. Les différents ligands de la voie NF-κB

4.2.La cascade de signalisation du NF-κB

Les dimères de la protéine NF-κB comme facteur de transcription nucléaire, ils doivent migrer vers le noyau, se combiner avec l'ADN pour avoir une fonction. Dans la plupart des types de cellules normales au repos, le NF-KB est inactif et reste dans le cytoplasme. Elles se lient à un inhibiteur spécifique appelé protéine IK-B, qui peut se lier au domaine d'homologie Rel (RHD) du NF-κB et interférer avec la fonction de sa séquence de localisation nucléaire (NLS). Ces protéines inhibitrices, qui comprennent IκBa, IκBb et IκBg, contiennent 6 à 7 répétitions d'ankyrine qui assurent la liaison avec le RHD. Ces répétitions sont également présentes dans les moitiés C-terminales des précurseurs NF-κB2/p100 et NF-κB1/p105, qui fonctionnent également comme des IκB et retiennent leurs partenaires, les protéines Rel, dans le cytoplasme. Afin d'activer le NF-κB moléculaire, les cellules doivent d'abord séparer la protéine NF-κB de ses inhibiteurs. Il existe deux grandes voies de signalisation qui conduisent à la dissociation de la protéine IK-B inhibitrice du NF-κB dimère et permettent la translocation des dimères NF-κB du cytoplasme vers le noyau.

a. Cascade canonique/classique

La signalisation en cascade canonique ou classique commence à partir du récepteur de surface cellulaire des cytokines pro-inflammatoires et des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), tels que le récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), le récepteur de type péage (TLR) et le récepteur des cellules T/B. Ces récepteurs se lient à leurs ligands par l'intermédiaire d'un système de liaison. Ces récepteurs se lient à leurs molécules ligand et transfèrent le signal à travers la membrane cellulaire, provoquant l'activation du complexe I κ B kinase (IKK). La forme la plus courante de ce complexe consiste en un hétérodimère des sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ . L'unité IKK γ est également appelée NEMO pour NF- κ B essential modulator. Le complexe IKK activé, agissant principalement par l'intermédiaire de IKK β de manière IKK γ -dépendante, catalyse la phosphorylation des I κ B (sur des sites équivalents à Ser32 et Ser36 d'I κ B α), la polyubiquitination (sur des sites équivalents à Lys21 et Lys22 d'I κ B α) et la dégradation ultérieure par le protéasome 26S. Les dimères NF- κ B libérés (le plus souvent le dimère p50-RelA), se déplacent vers le noyau, se lient à l'ADN et activent la transcription du gène en aval.

b. Cascade de voies non canonique/alternative

Une autre voie d'activation du NF- κ B appelée voie non canonique ou alternative. Cette voie est indépendante de IKK β et IKK γ , mais dépend plutôt de l'atténuation de IKK α . Le transfert de la signalisation dans le cytoplasme par le récepteur LT- β ou BAFF. Phosphatation d'une protéine NIK, la protéine NIK phosphate ensuite les homodimères de IKK α . La cible des homodimères IKK α dans cette voie est NF- κ B2/p100, qui est phosphorylé sur deux sites C-terminaux. La phosphorylation de ces sites est essentielle pour la transformation de p100 en p52, qui dépend également de la polyubiquitination et de la dégradation protéasomique. Cependant, au lieu de conduire à une dégradation complète de p100, comme on le voit avec les I κ B, l'ubiquitination de p100 dépendante de la phosphorylation n'entraîne que la dégradation de ses demi-parties C-terminales inhibitrices. Une fois la moitié C-terminale dégradée, la partie N-terminale du NF- κ B (le polypeptide p52 qui contient le RHD) est libérée. Comme le RHD de p100 est le plus souvent associé à RelB, l'activation de cette voie " alternative " entraîne la translocation nucléaire des dimères p52-RelB. Le dimère se lie finalement à l'ADN et active la transcription du gène en aval.

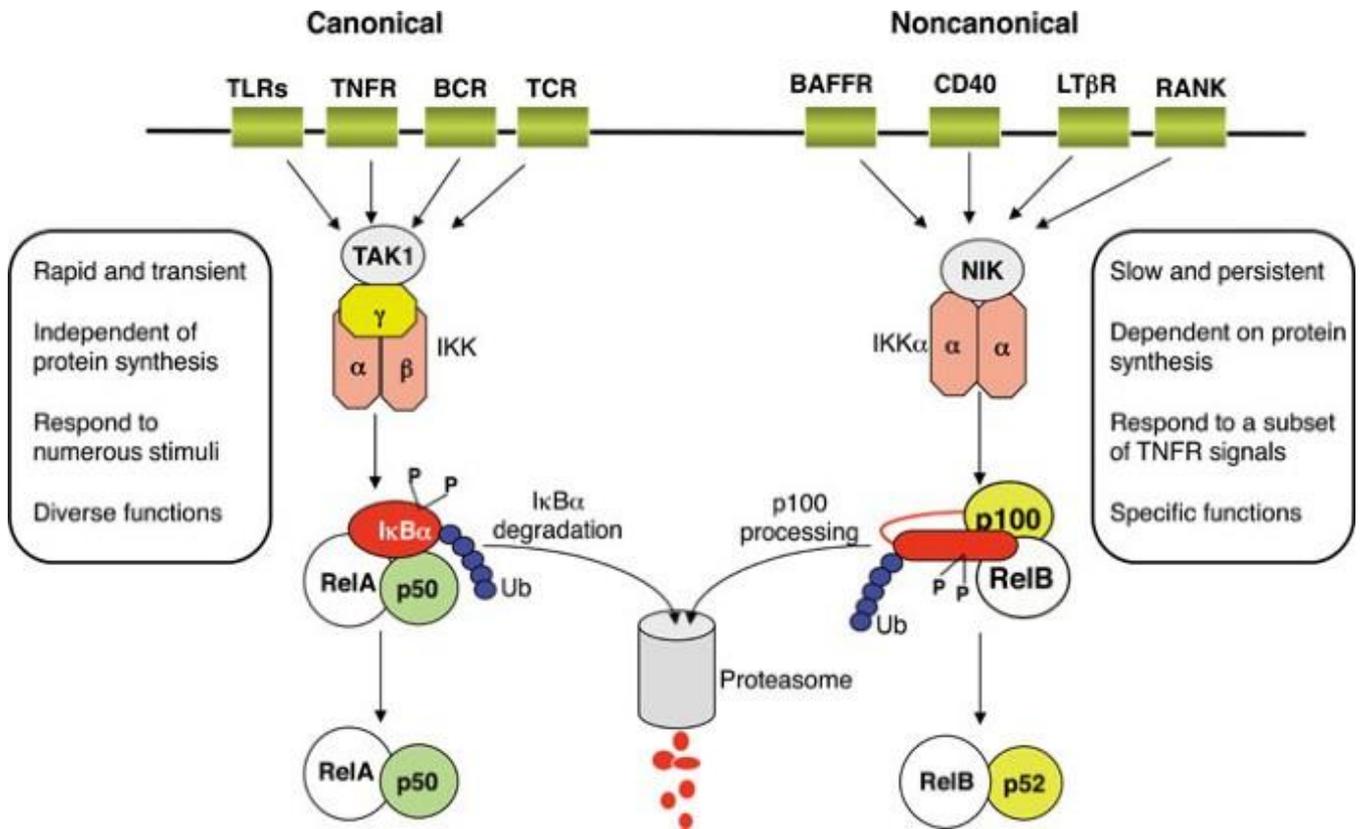


Fig. 6. La cascade de signalisation du NF-κB

