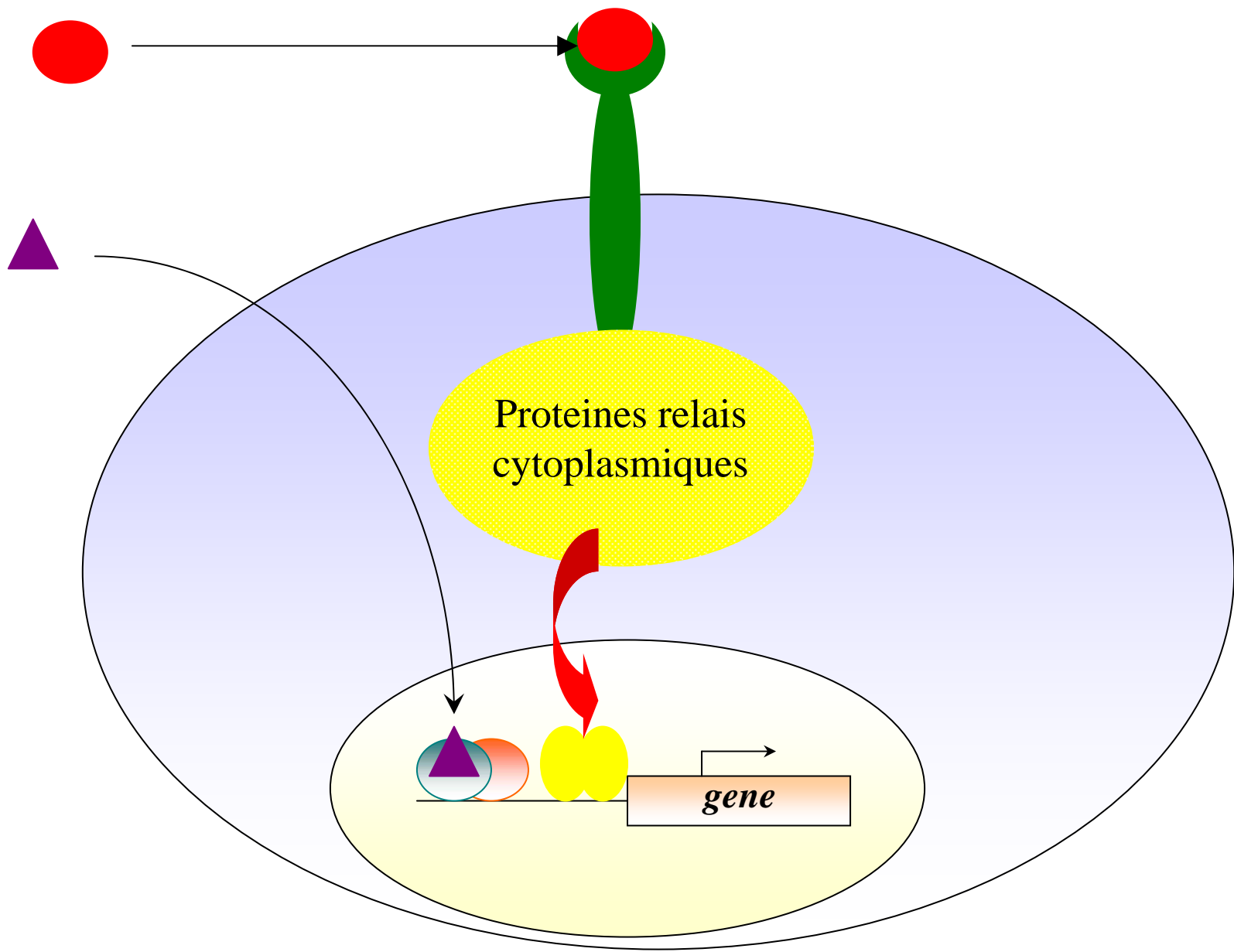


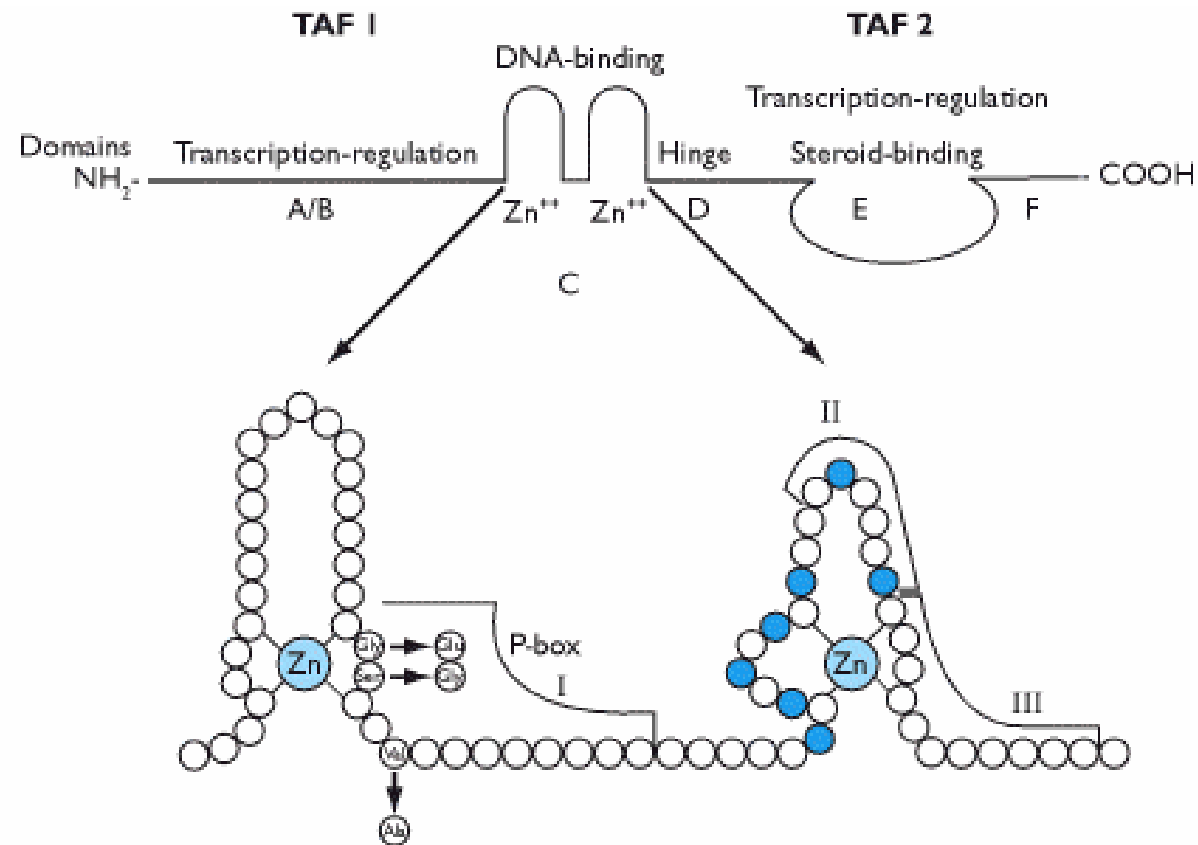
Transduction du signal :

De la membrane au noyau

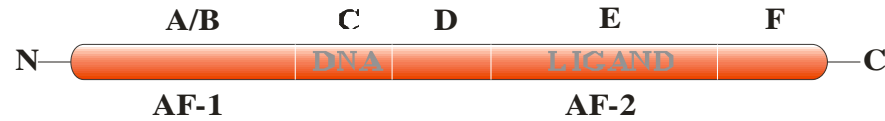
Céline Brand (Lille, INSERM U545)



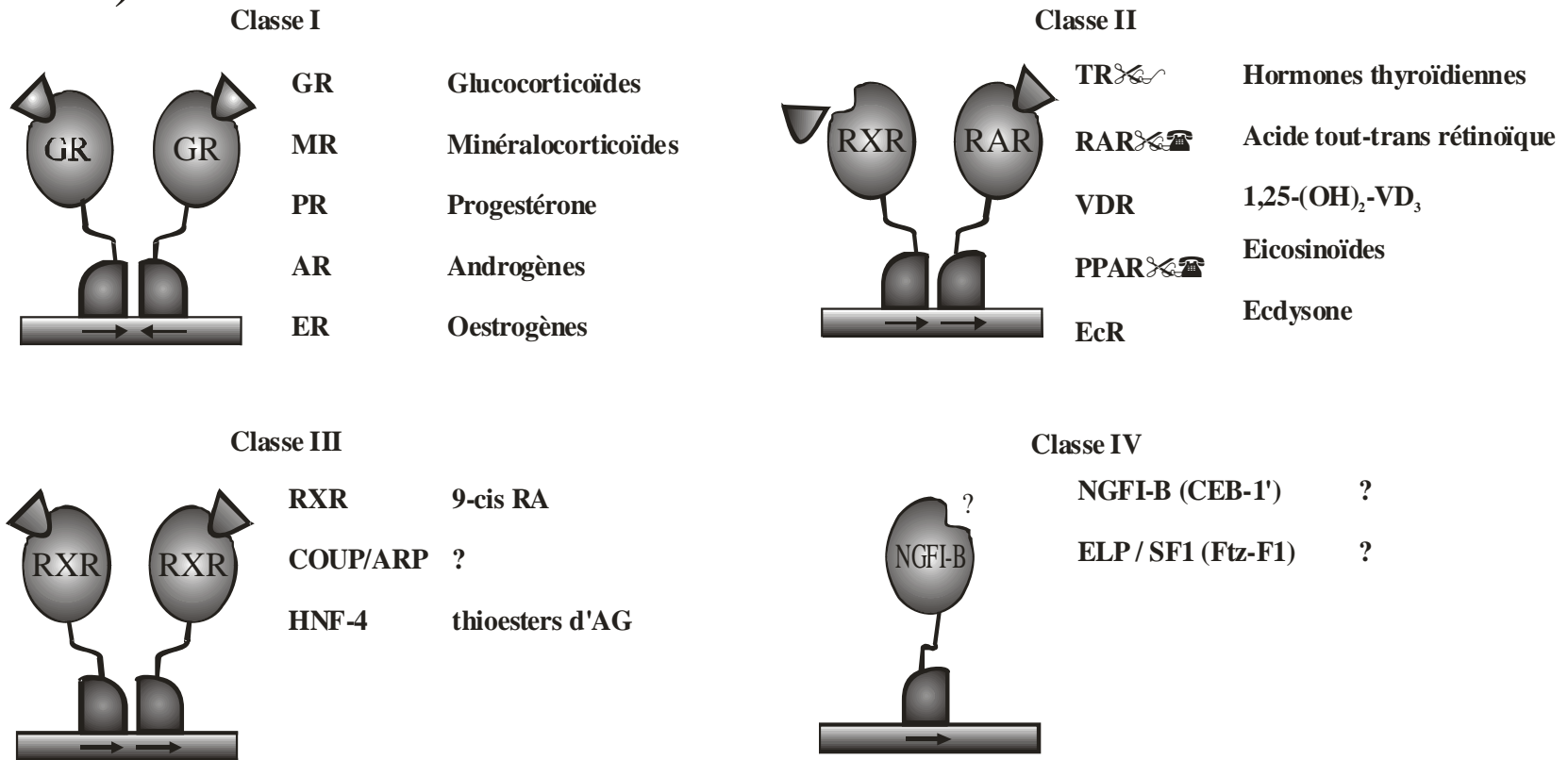
Les récepteurs nucléaires



a)



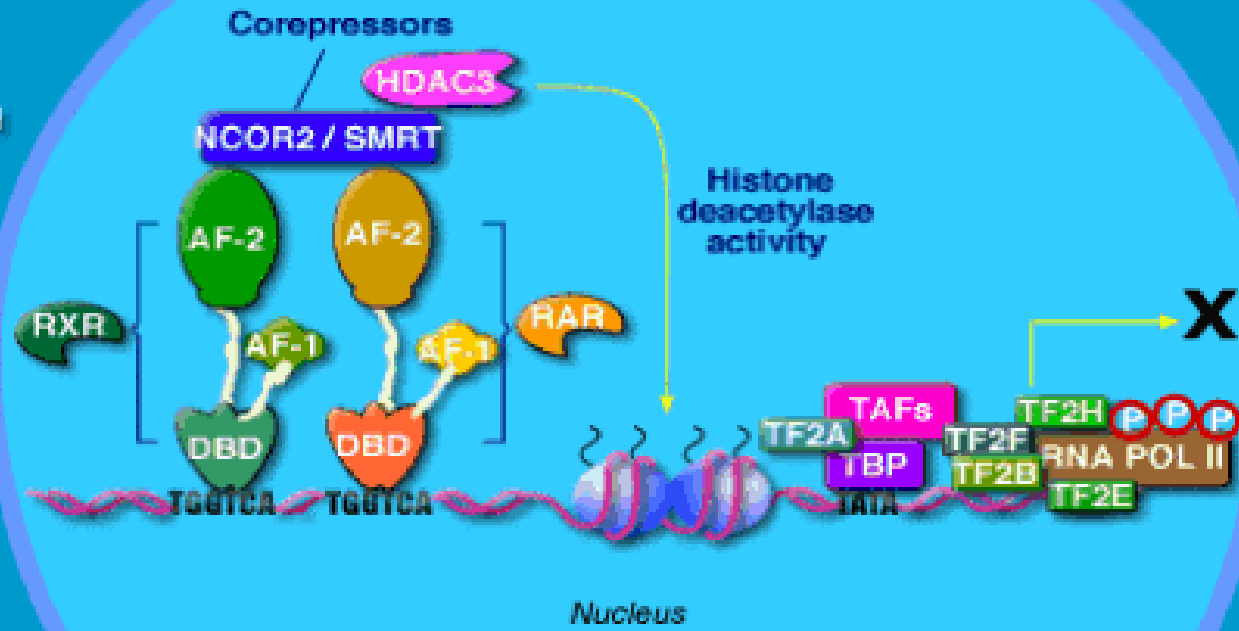
b)





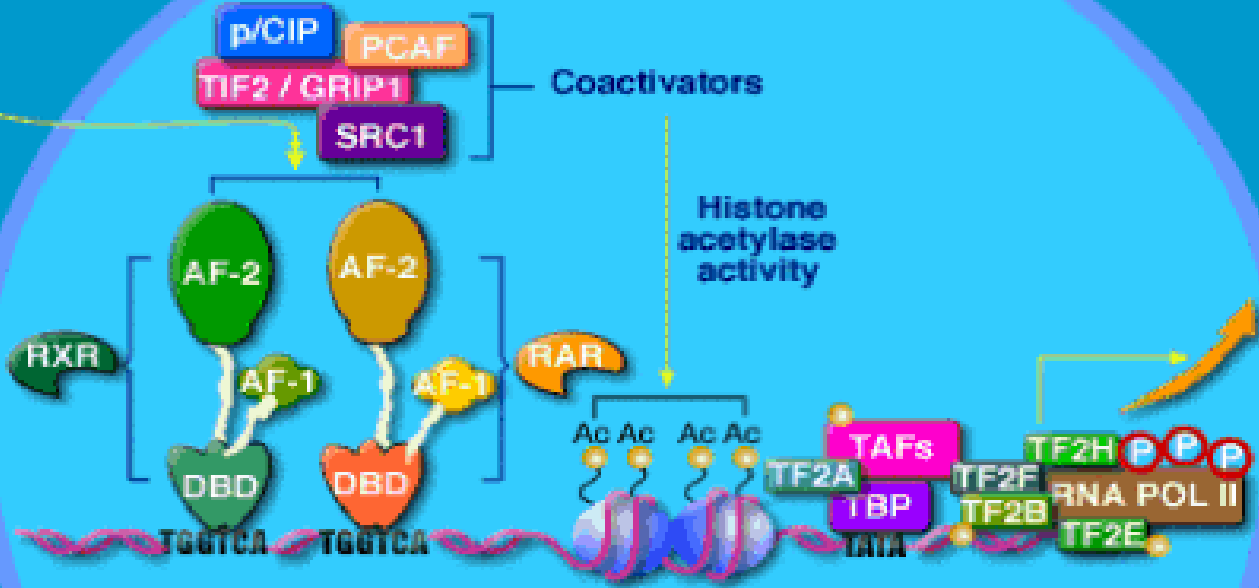
Cytoplasm

No ligand



Bound ligand
Retinoids
tRA or 9cisRA

Cytoplasm



Nucleus

Récepteurs tyrosine kinase-linked

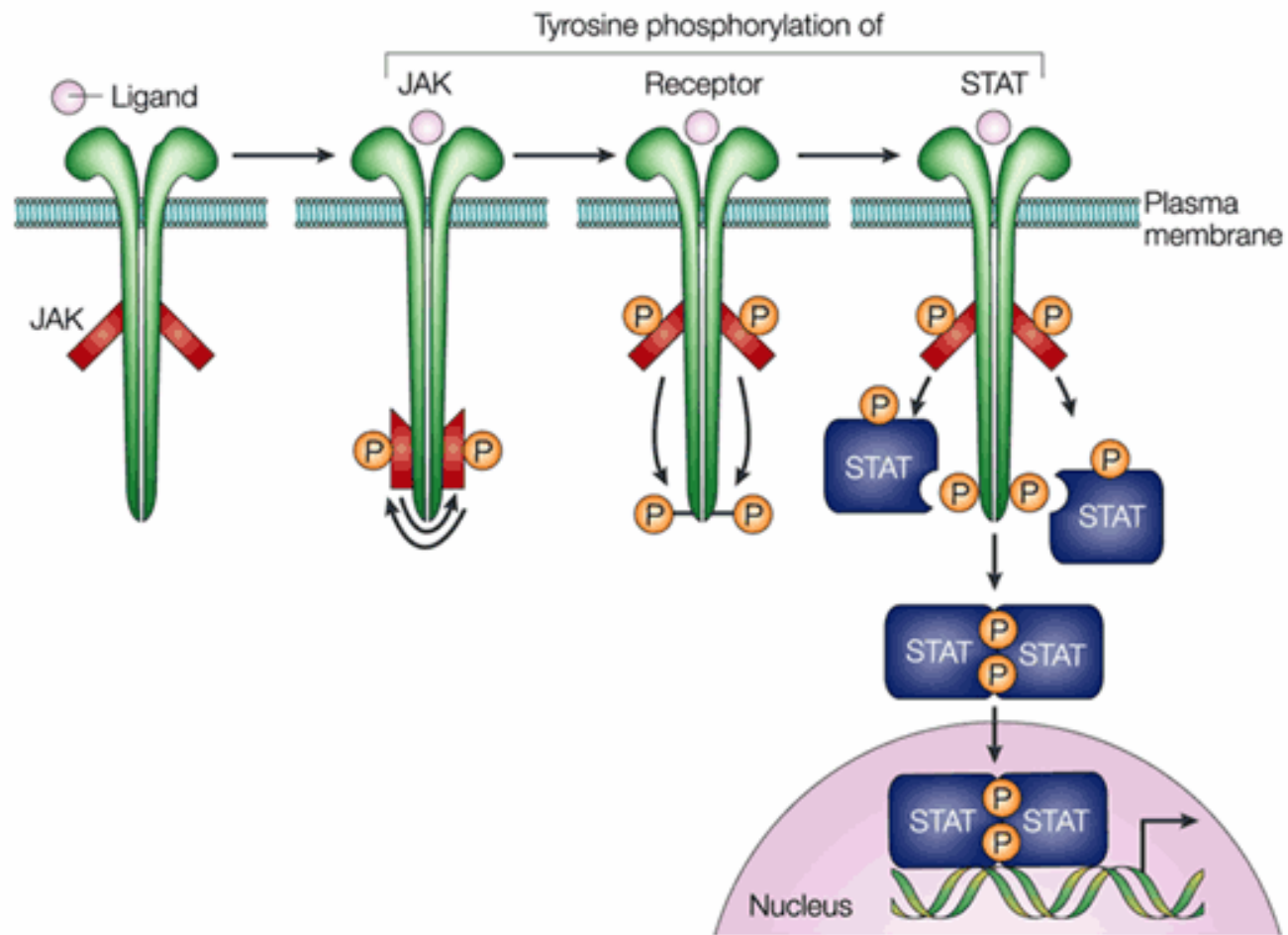
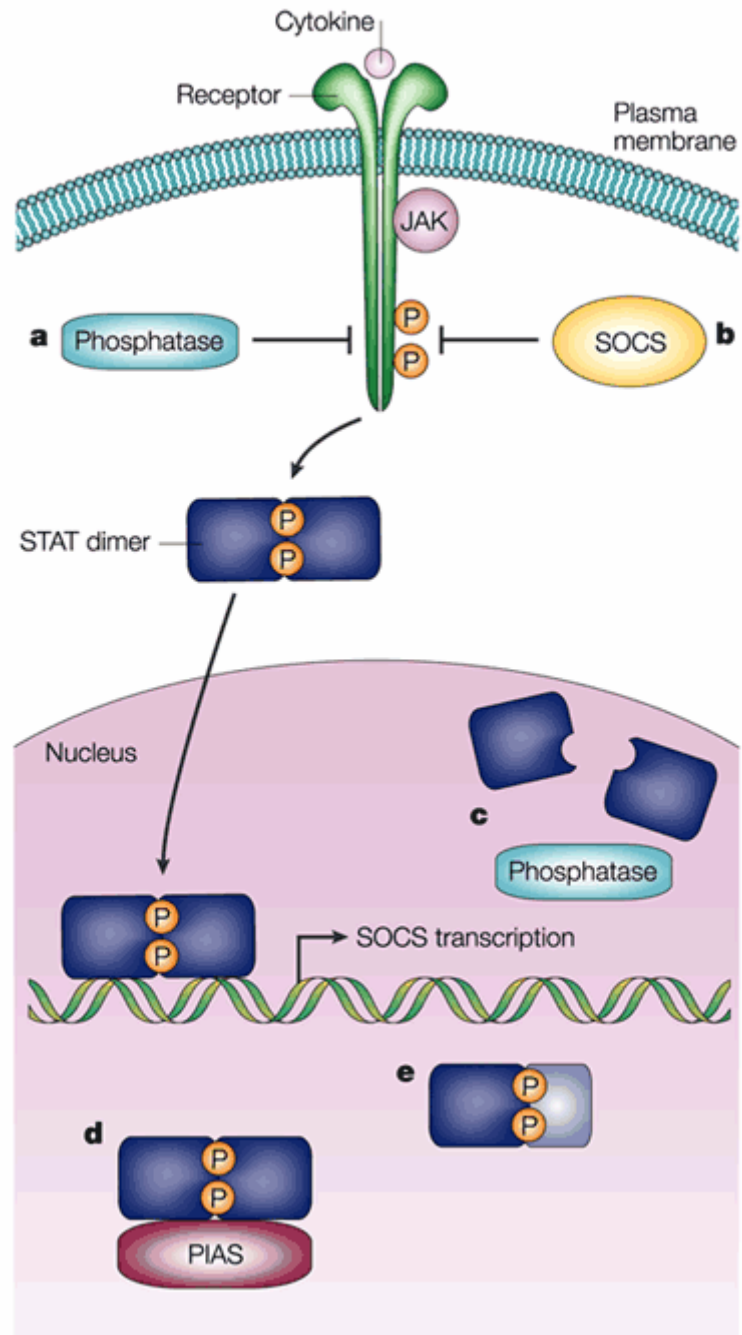


TABLE 12-2 STAT AND JAK INTERACTION WITH SELECTED CYTOKINE RECEPTORS DURING SIGNAL TRANSDUCTION

Cytokine receptor	JAK	STAT
IFN- γ	JAK1 and JAK2	Stat1
IFN- α/β	JAK1 and Tyk-2	Stat2
IL-2	JAK1 and JAK3	Stat5
IL-3	JAK2	Stat5
IL-4	JAK1 and JAK3	Stat6
IL-6	JAK1 (and sometimes others)	Stat3
IL-10	JAK1 and Tyk-2*	Stat3
IL-12	JAK2 and Tyk-2*	Stat4

*Despite its name, Tyk-2 is also a Janus kinase.

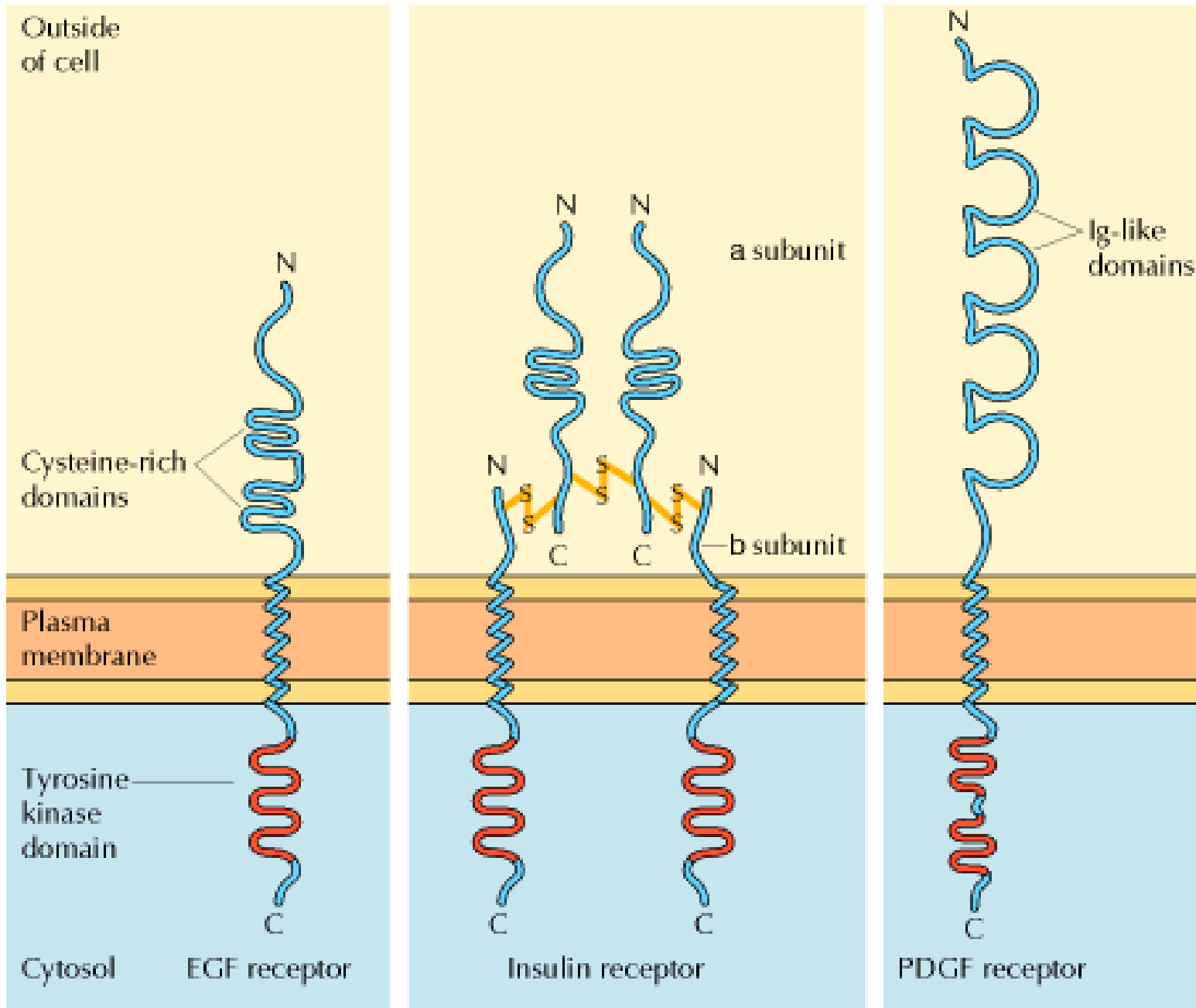
SOURCE: Adapted from Bach, Aguet, and Schreiber, 1997, *Annu. Rev. Immun.* 15:563.

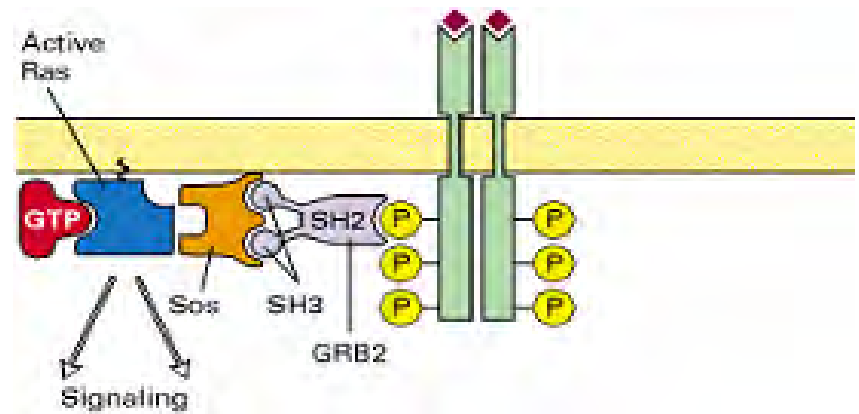
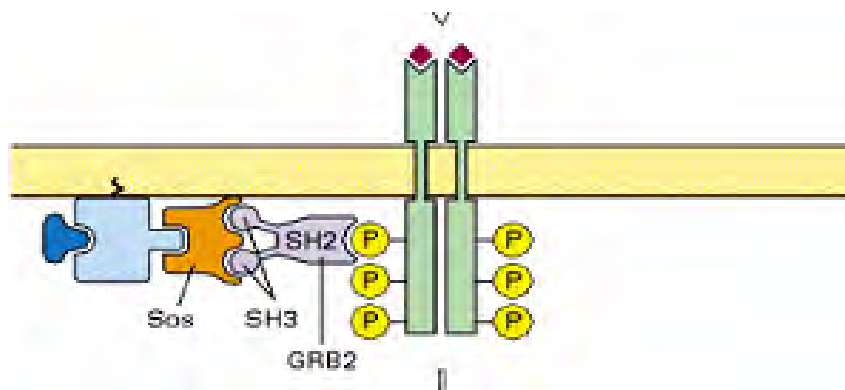
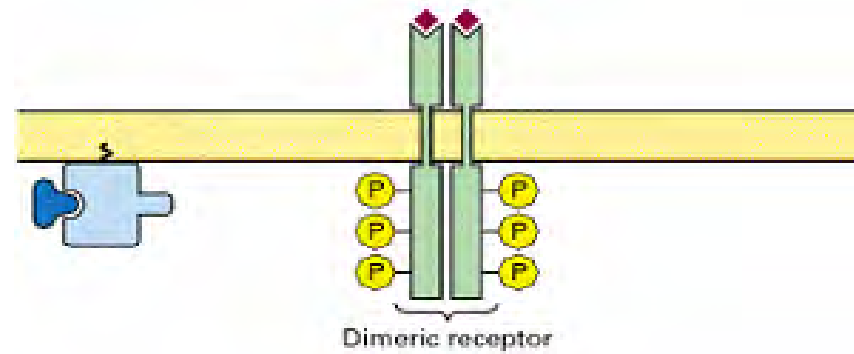
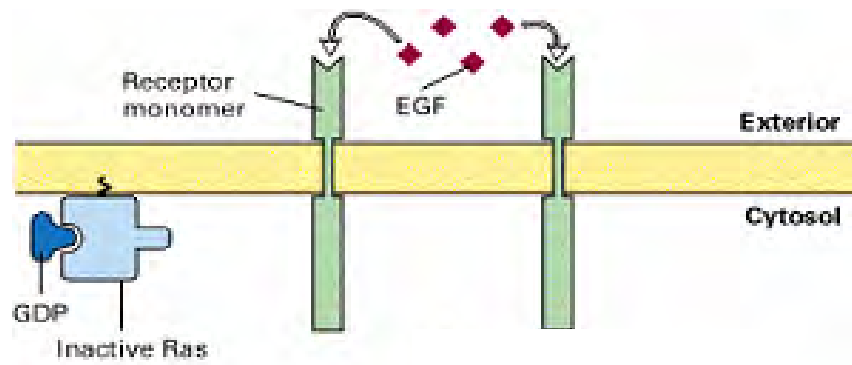


- Souris KO pour Stat1 sont très sensibles aux infections
- Mutation de Stat1 diminue la résistance à l'infection provoquées par des mycobactéries
- Absence de Stat4 diminue le développement de NK pendant infection virale
- Stat/Jak cible des pathogènes

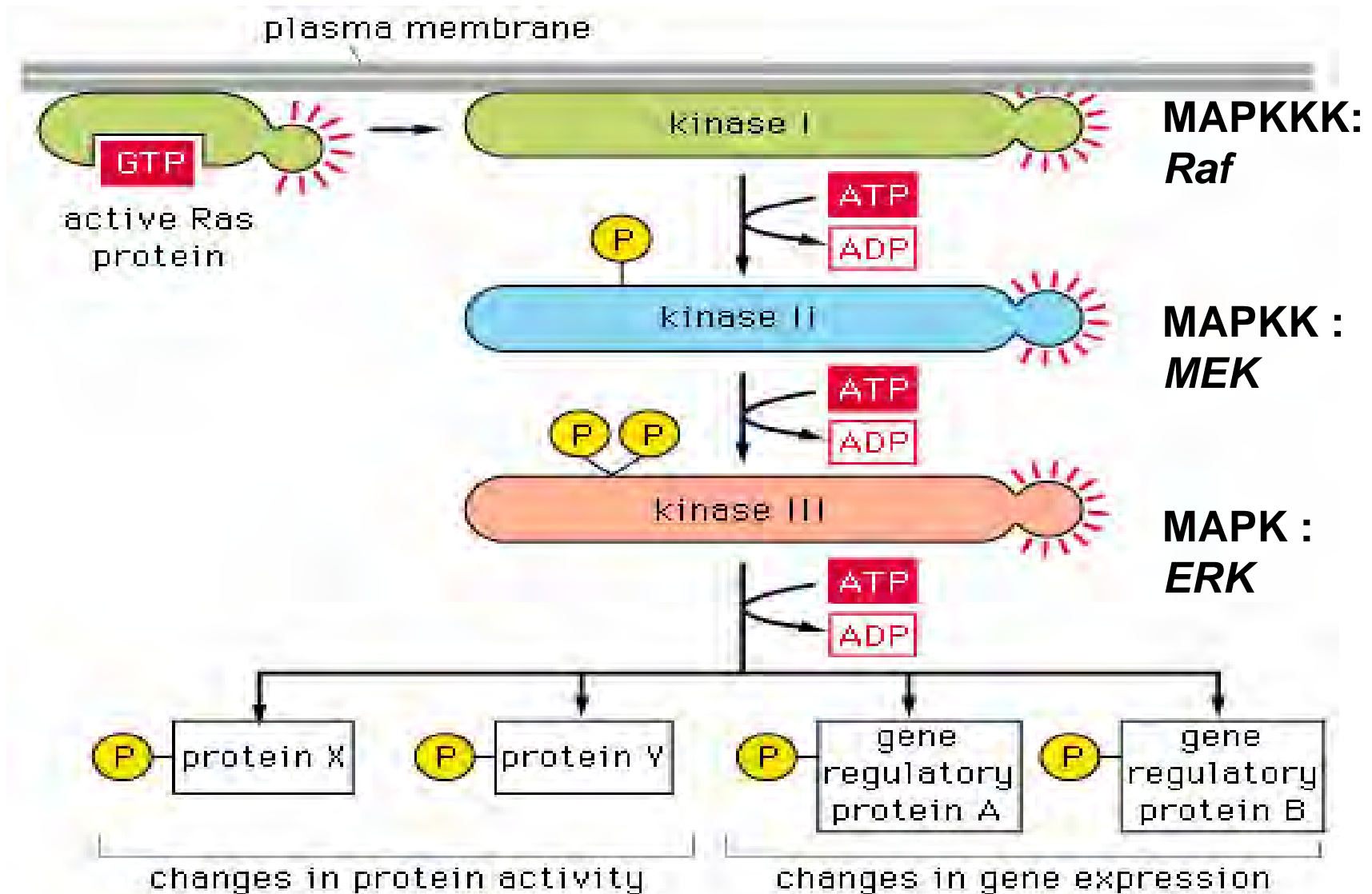
Les récepteurs tyrosine kinase

- Au moins 14 sous familles
- Classe I : EGF
- Classe II : Insuline, IGF-1
- Classe III : PDGF
- Classe IV : FGF
- Classe V : VEGF
- Classe VI : HGF
- Classe VII : neurotrophines

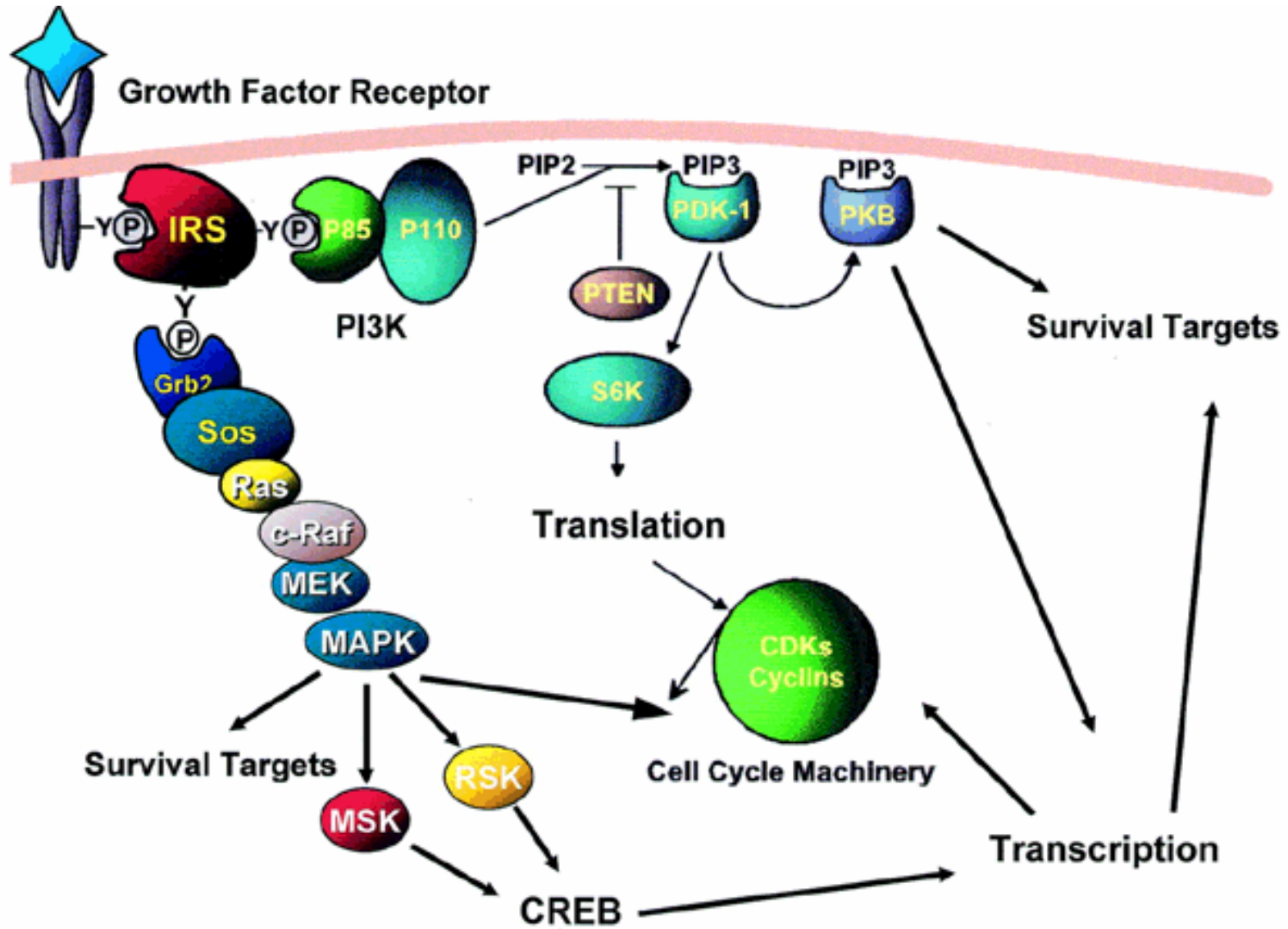




Les récepteurs tyrosine kinase

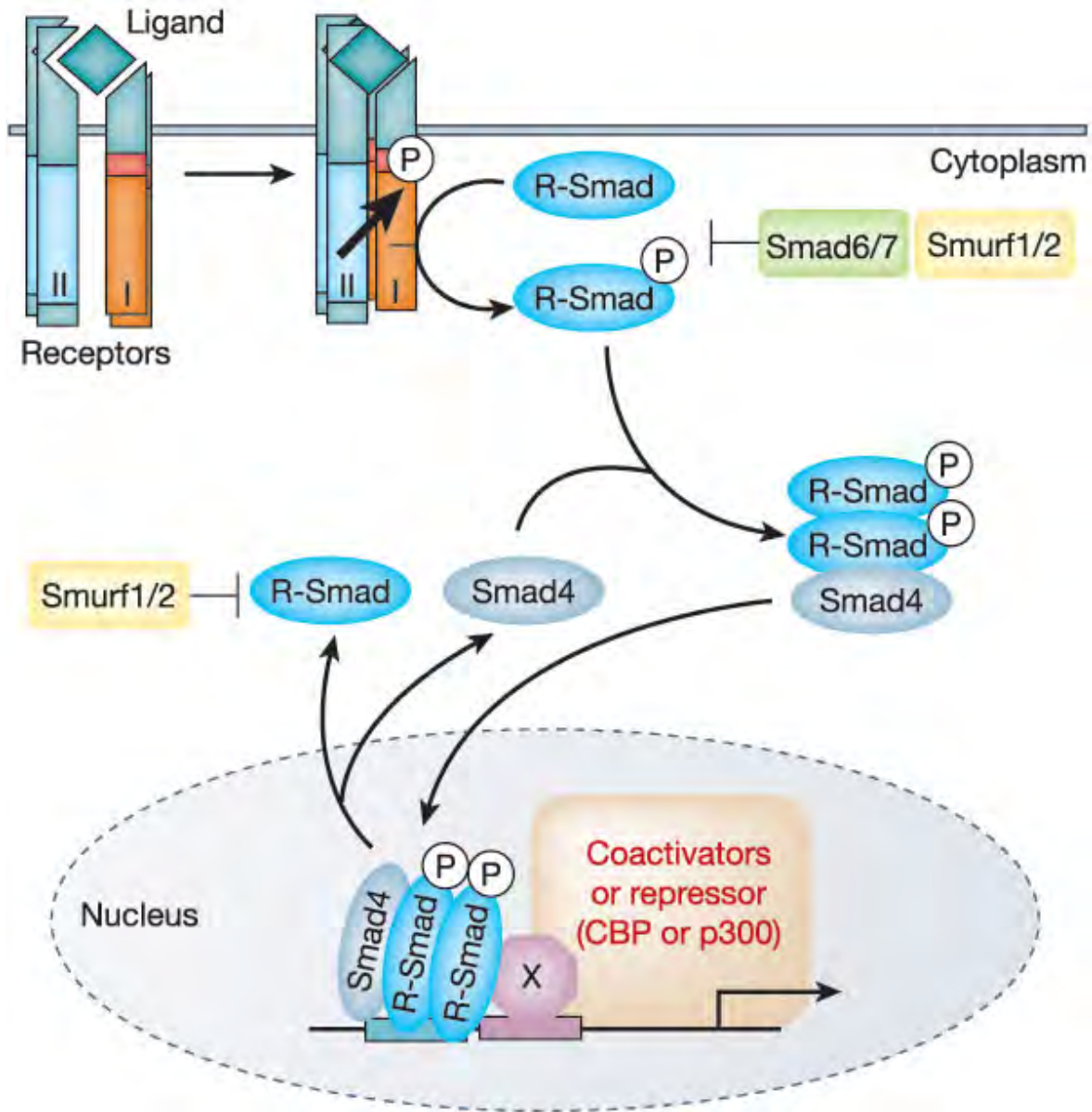


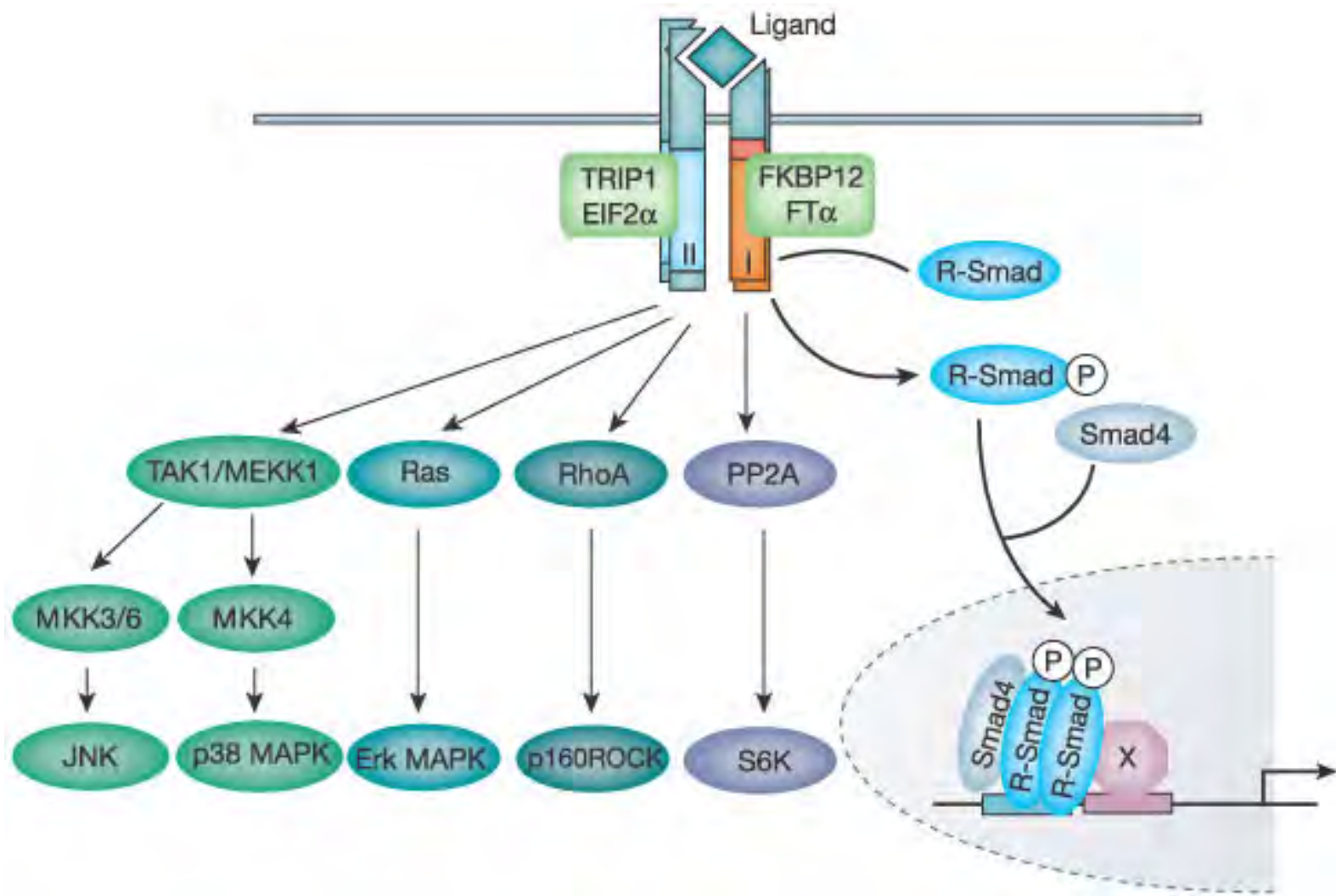
Les récepteurs tyrosine kinase



Les récepteurs Ser/Thr Kinase

- Famille TGF β :
 - TGF β 1, 2 et 3
 - Activines
 - BMP
- TGF β anti-inflammatoire, maintient la tolérance (prolifération, différenciation des lymphocytes)
- Recrutement des leucocytes, survie des lymphocytes T, des NK, macrophages..





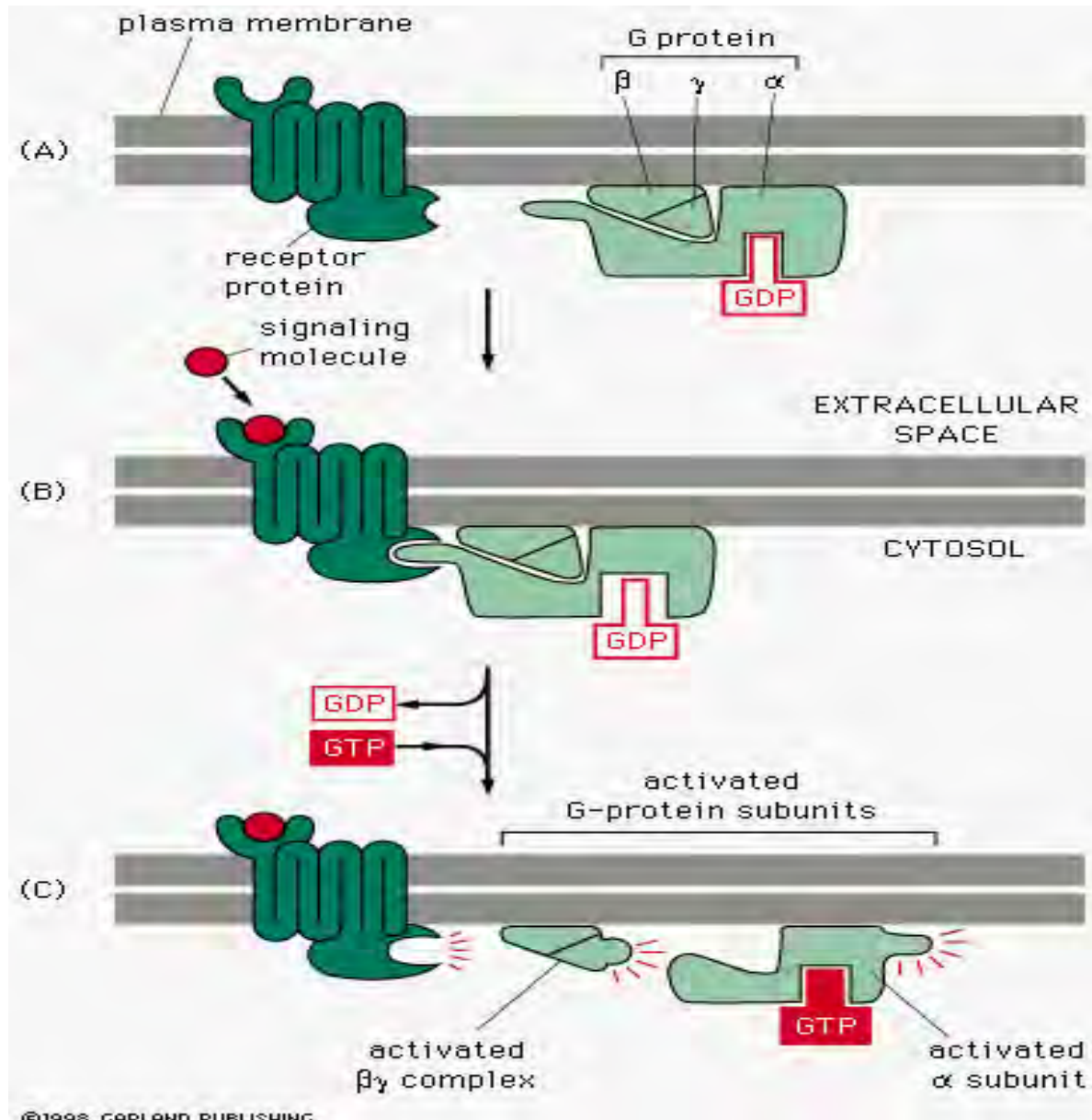
TGF β et infections

- *Trypanosoma cruzi* utilise les récepteurs TGF β pour entrer dans la cellule et augmente la quantité de TGF β
- Souches virulentes de *Leishmania*, de *Toxoplasma gondii*, mycobactéries augmentent TGF β actif par macrophages (diminution production de NO et TNF α)
- Effet protecteur contre malaria et listeria, candida albicans chez la souris
- Activation de TGF β par neuramidase des virus influenza

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires : GPCR

- Classe A : récepteur de la lumière (rhodopsine), adrénaline, sous-groupe olfactif, **chemokines**, **prostaglandines**
- Classe B : famille des hormones peptidiques gastrointestinales et GHRH, CRH, calcitonine et hormone parathyroïdienne
- Classe C : métabotropiques du glutamate, GABA

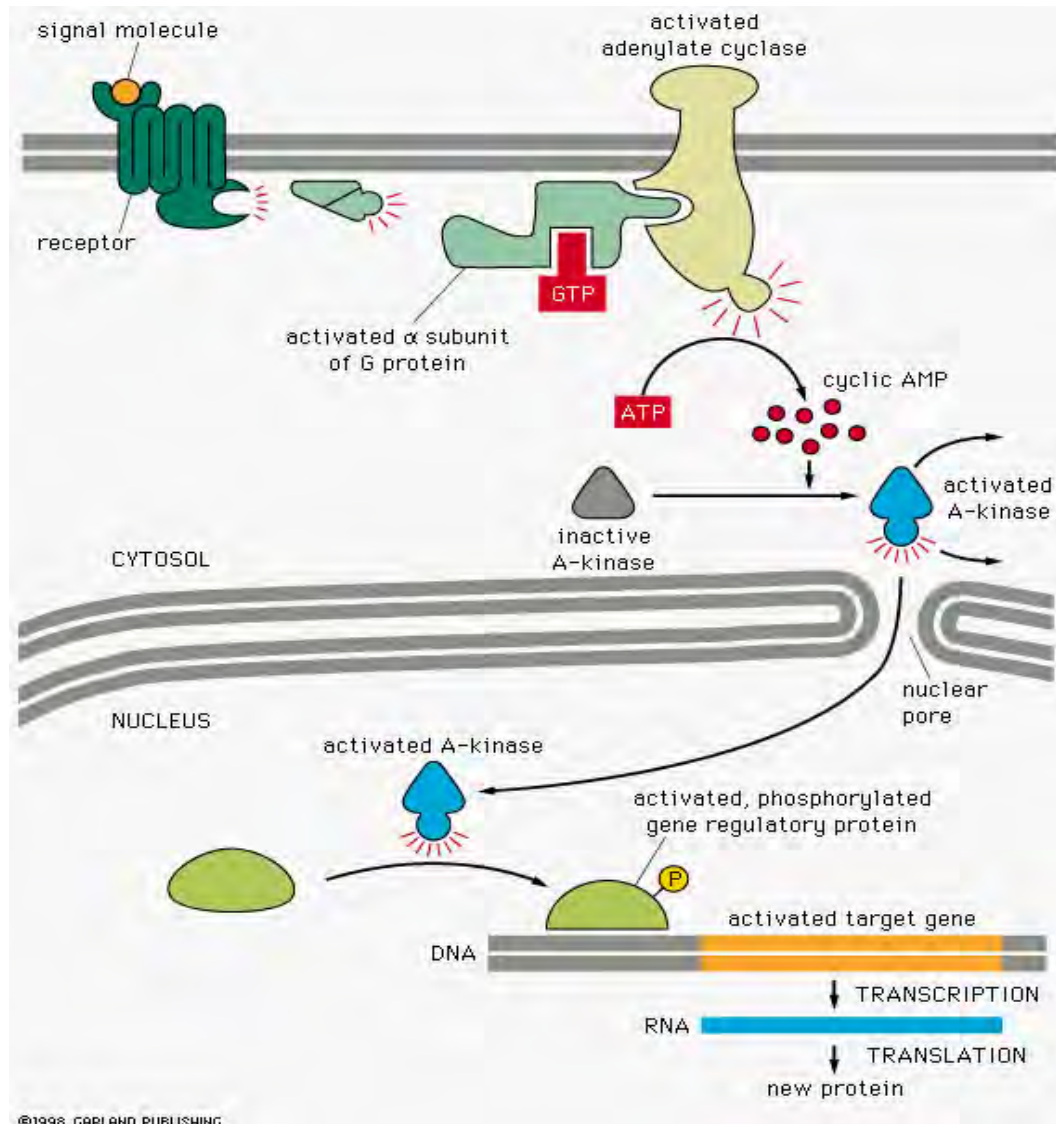
G-Protein-Coupled Receptors



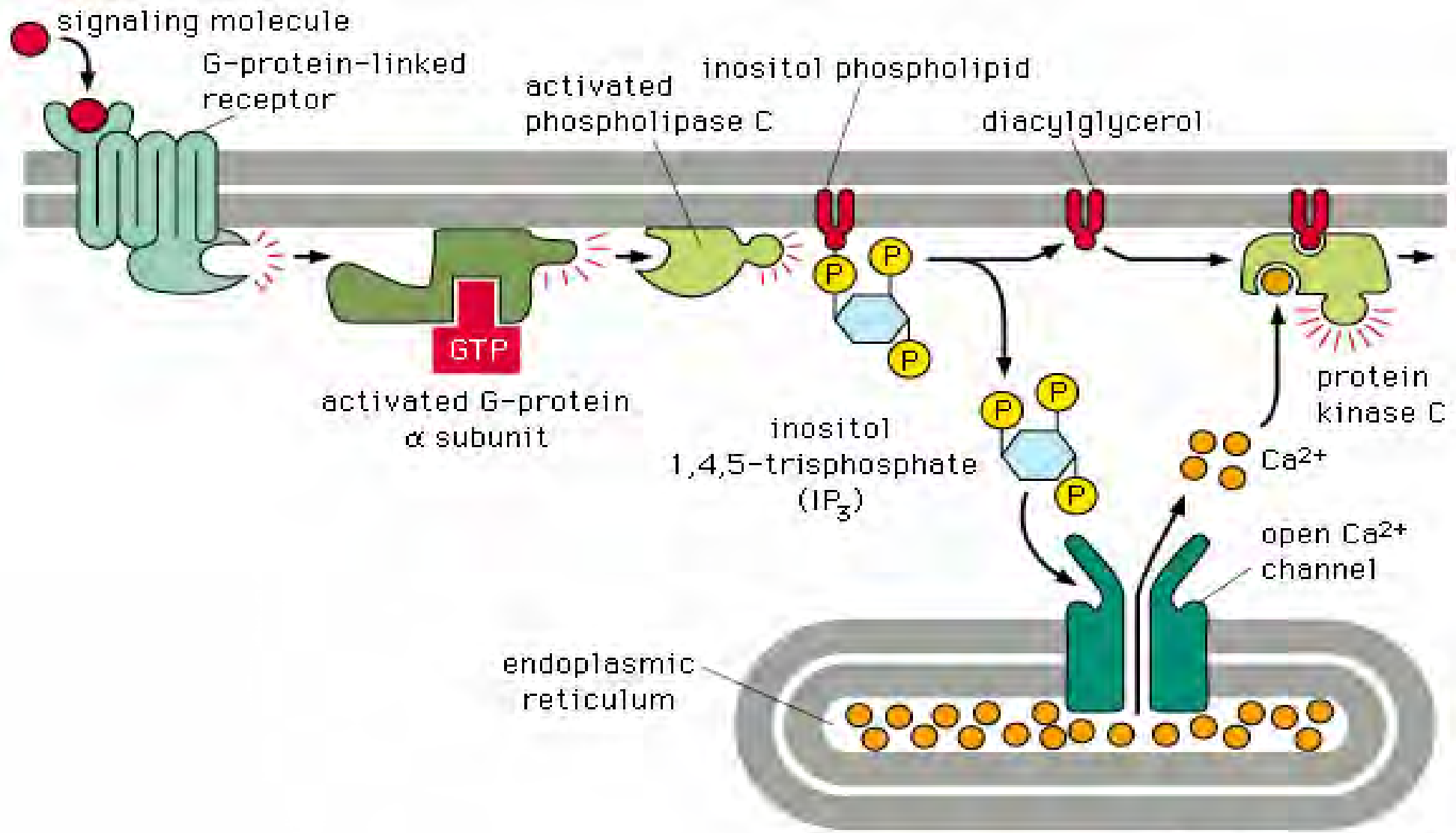
Différentes protéines G/différentes voies

- $G\alpha_s$: augmentation AMPc
- $G\alpha_i$: diminution AMPc
- $G\alpha_q$: activation de PLC
- $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$: protéines Rho
- $G\beta\gamma$: Kinases (GRK, MAP kinase)

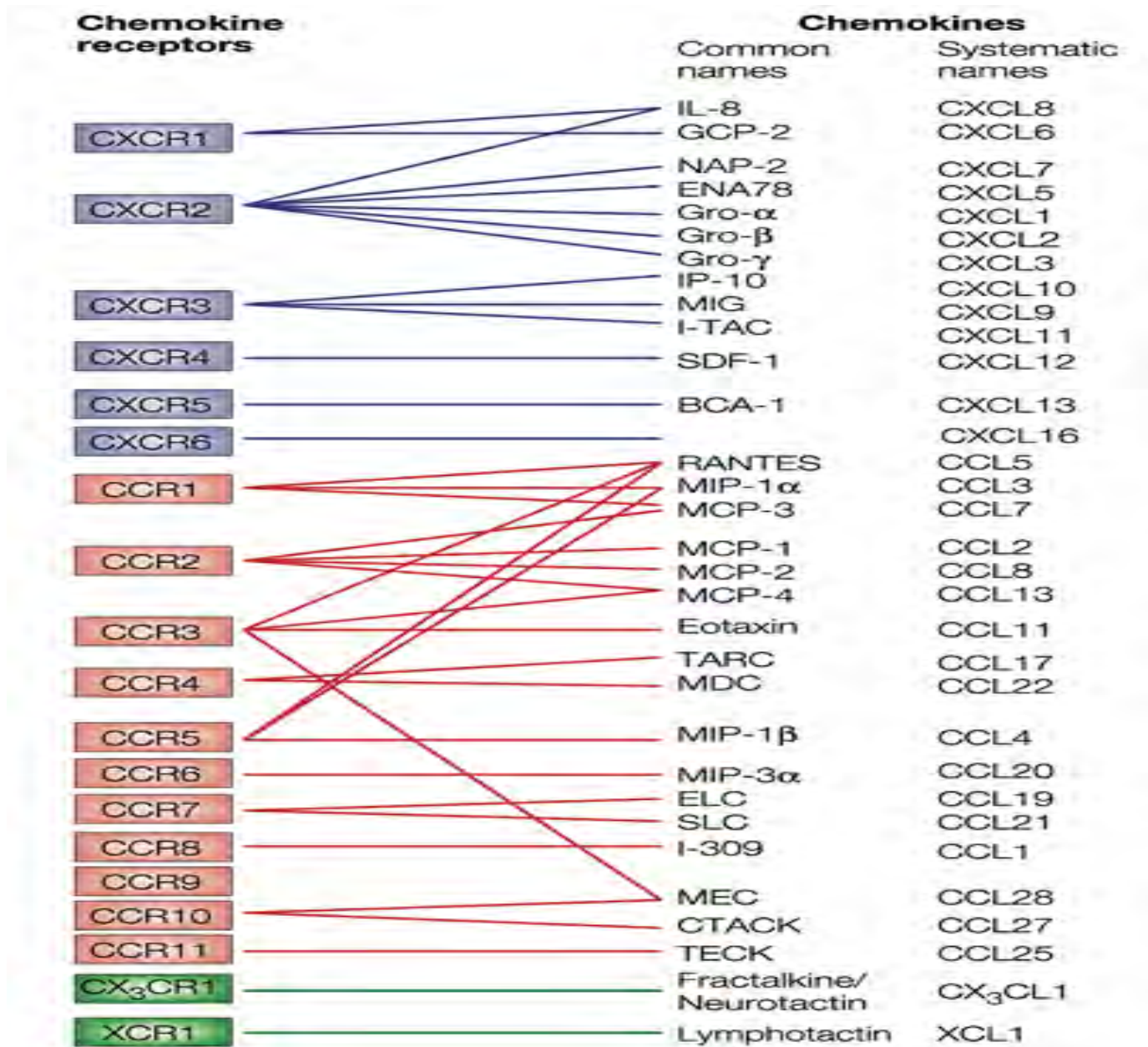
cAMP-Mediated Signaling



Phospholipase C Pathway and Calcium

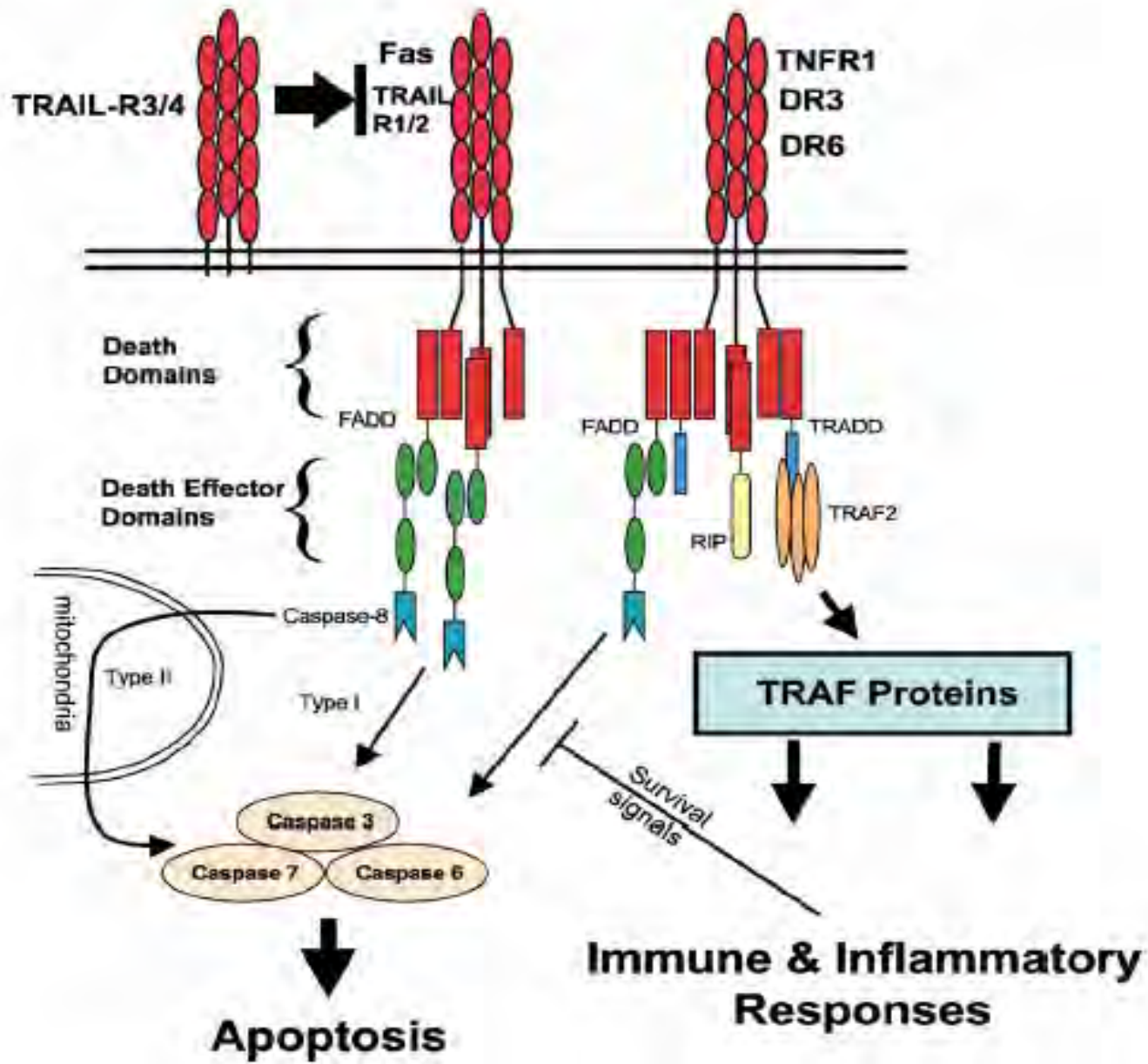


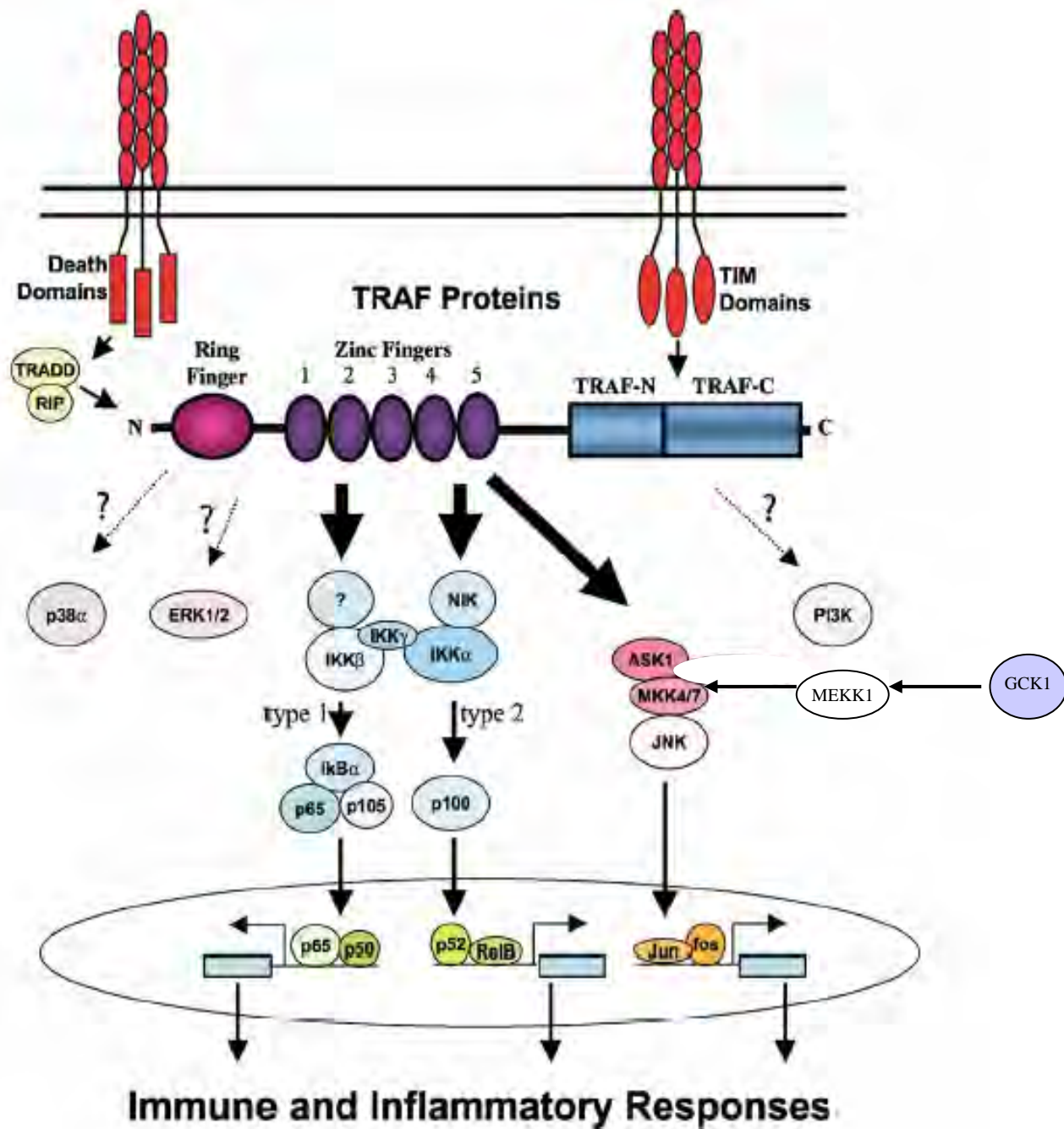
Chemokines



Transduction du signal de la famille TNF

- TNF α produit comme une protéine membranaire trimérique. Clivage par TACE (TNF alpha converting enzyme) et relargage de la forme soluble
- Trois types de récepteurs selon la séquence intracellulaire et la transduction :
 - Fas, TNF-R1 (Constitutif Ubiquitaire), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 et DR6 : motifs DD (death domain) .
 - TNF-R2 (Inductible, Cellules immunitaires. Lie TNF α membranaire), CD40, CD30, CD27, RANK : motifs TIM (TRAF-Interacting Motif).
 - TRAIL-R3, TRAIL-R4 : pas de motif ➡ pas de transduction, compétition?





Récepteurs Toll-like

Receptor	Ligand	Origin of ligand	References
TLR1	Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	112
	Soluble factors	<i>Neisseria meningitidis</i>	113
TLR2	Lipoprotein/lipopeptides	Various pathogens	114
	Peptidoglycan	Gram-positive bacteria	115,116
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria	116
	Lipoarabinomannan	Mycobacteria	117
	Phenol-soluble modulín	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	118
	Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma cruzi</i>	119
	Glycolipids	<i>Treponema maltophilum</i>	120
	Porins	<i>Neisseria</i>	121
	Atypical lipopolysaccharide	<i>Leptospira interrogans</i>	122
	Atypical lipopolysaccharide	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	123
	Zymosan	Fungi	124
Heat-shock protein 70*	Host	125	
TLR3	Double-stranded RNA	Viruses	52
TLR4	Lipopolysaccharide	Gram-negative bacteria	9
	Taxol	Plants	126
	Fusion protein	Respiratory syncytial virus	127
	Envelope protein	Mouse mammary-tumour virus	128
	Heat-shock protein 60*	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	129,130
	Heat-shock protein 70*	Host	131
	Type III repeat extra domain A of fibronectin*	Host	132
	Oligosaccharides of hyaluronic acid*	Host	133
	Polysaccharide fragments of heparan sulphate*	Host	134
Fibrinogen*	Host	135	
TLR5	Flagellin	Bacteria	136
TLR6	Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	137
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria	116
	Zymosan	Fungi	138
TLR7	Imidazoquinoline	Synthetic compounds	139
	Loxoribine	Synthetic compounds	12
	Bropirimine	Synthetic compounds	12
	Single-stranded RNA	Viruses	140,141
TLR8	Imidazoquinoline	Synthetic compounds	142
	Single-stranded RNA	Viruses	140
TLR9	CpG-containing DNA	Bacteria and viruses	143
TLR10	N.D.	N.D.	–
TLR11	N.D.	Uropathogenic bacteria	144

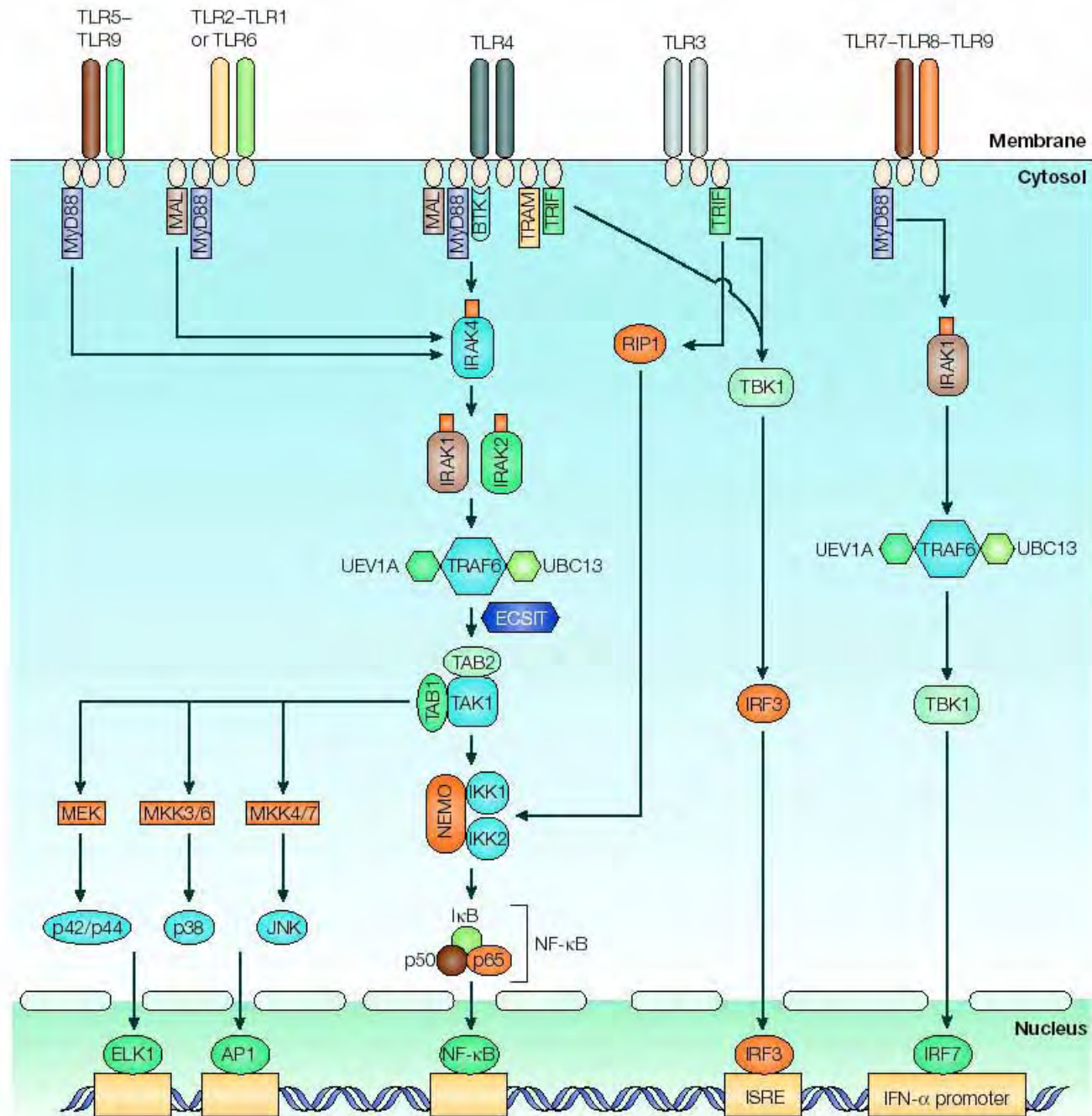
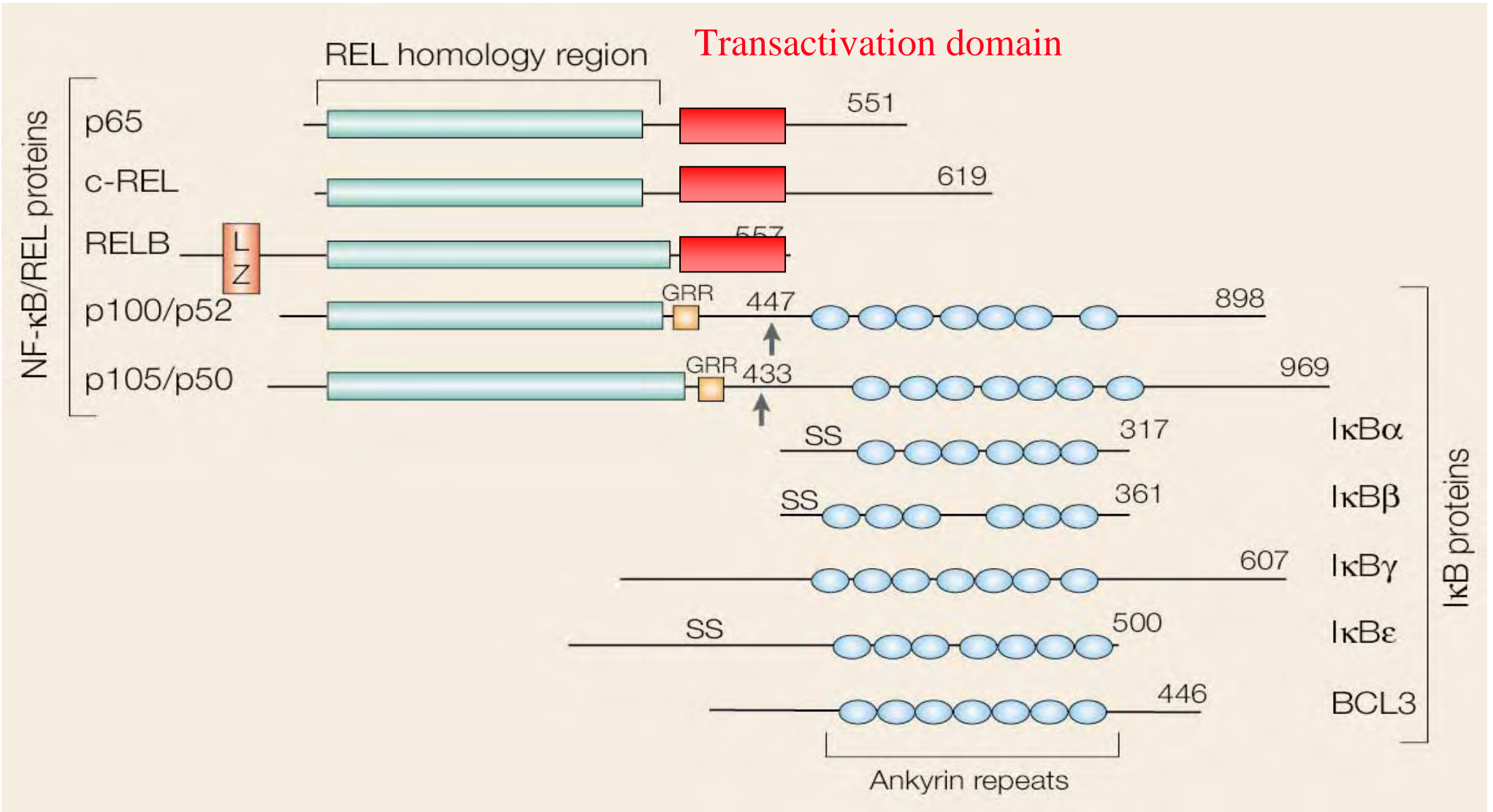


Figure 10.10. Signaling pathways of TLRs. TLR5-TLR9, TLR2-TLR1 or TLR6, TLR4, TLR3, and TLR7-TLR8-TLR9.

Contrôle négatif

- Récepteurs solubles
- TOLLIP : Interaction avec domaine TIR de TLR2 et TLR4 . Supprime la phosphorylation de IRAK1.
- MyD-88s : induction en réponse au LPS. Formation de dimère avec MyD-88 et recrutement préférentiel par domaine TIR du récepteur. Plus de recrutement de IRAK4
- IRAKM, IRAK2c et IRAK2a
- Récepteurs membranaires (ST2L, SIGIRR)
- SOCS inhibent l'activation de IRAK

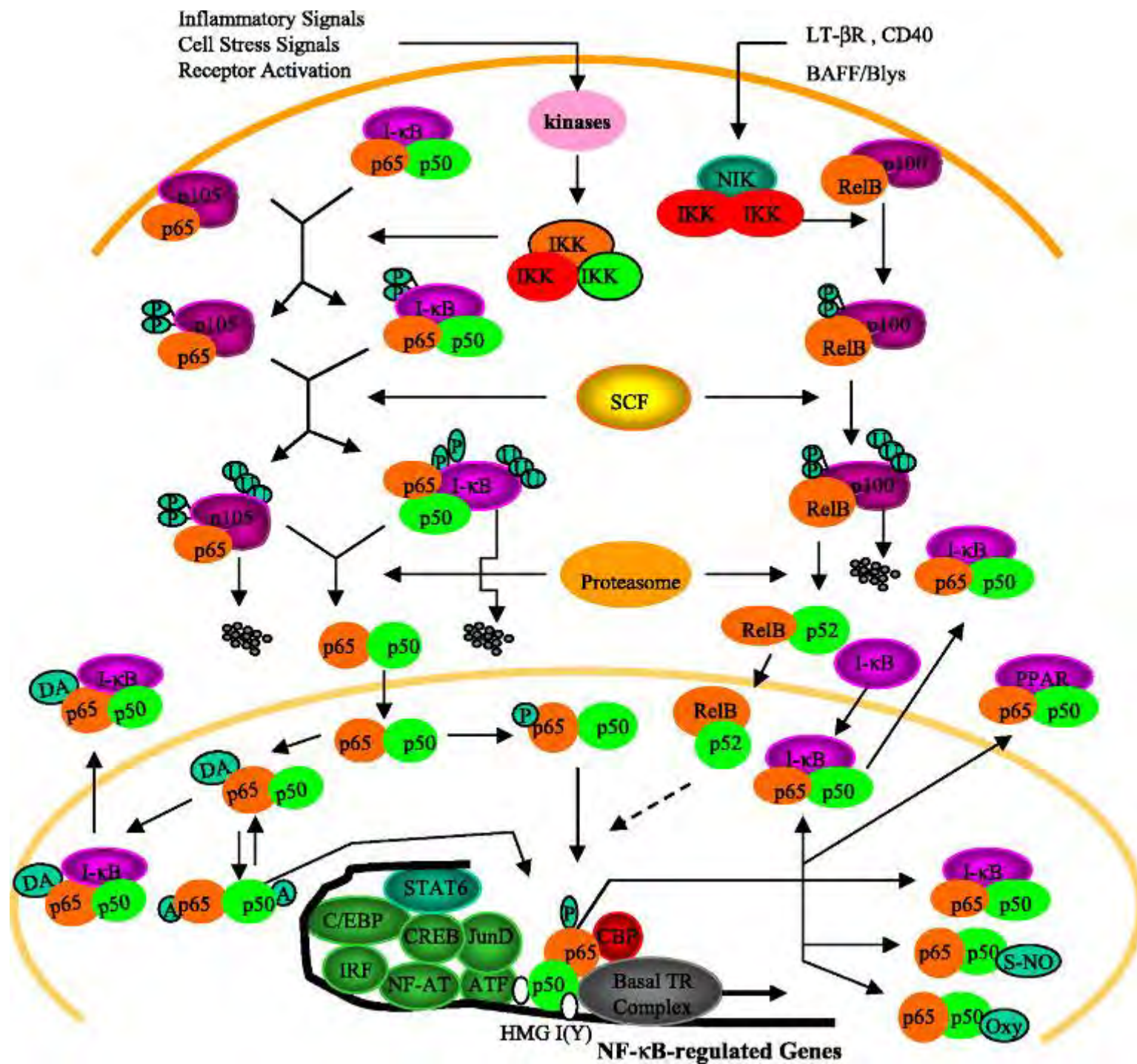


Formation des dimères

- Différents homo ou hétérodimères selon le stimulus, type cellulaire
 - Exception: RelB interagit uniquement avec p50/p52
 - Forme la plus répandue : p50/p65 (NF- κ B1/RelA)
 - Séquence de liaison à l'ADN, interaction avec I κ B et activité transcriptionnelle différente selon dimère

Mécanismes d'inhibition par I κ B

- Sequestration des dimères NF- κ B dans le cytoplasme
 - Masquage du NLS
 - NES de I κ B
- Augmente la dissociation NF- κ B/ADN
- Exportation des dimères du noyau

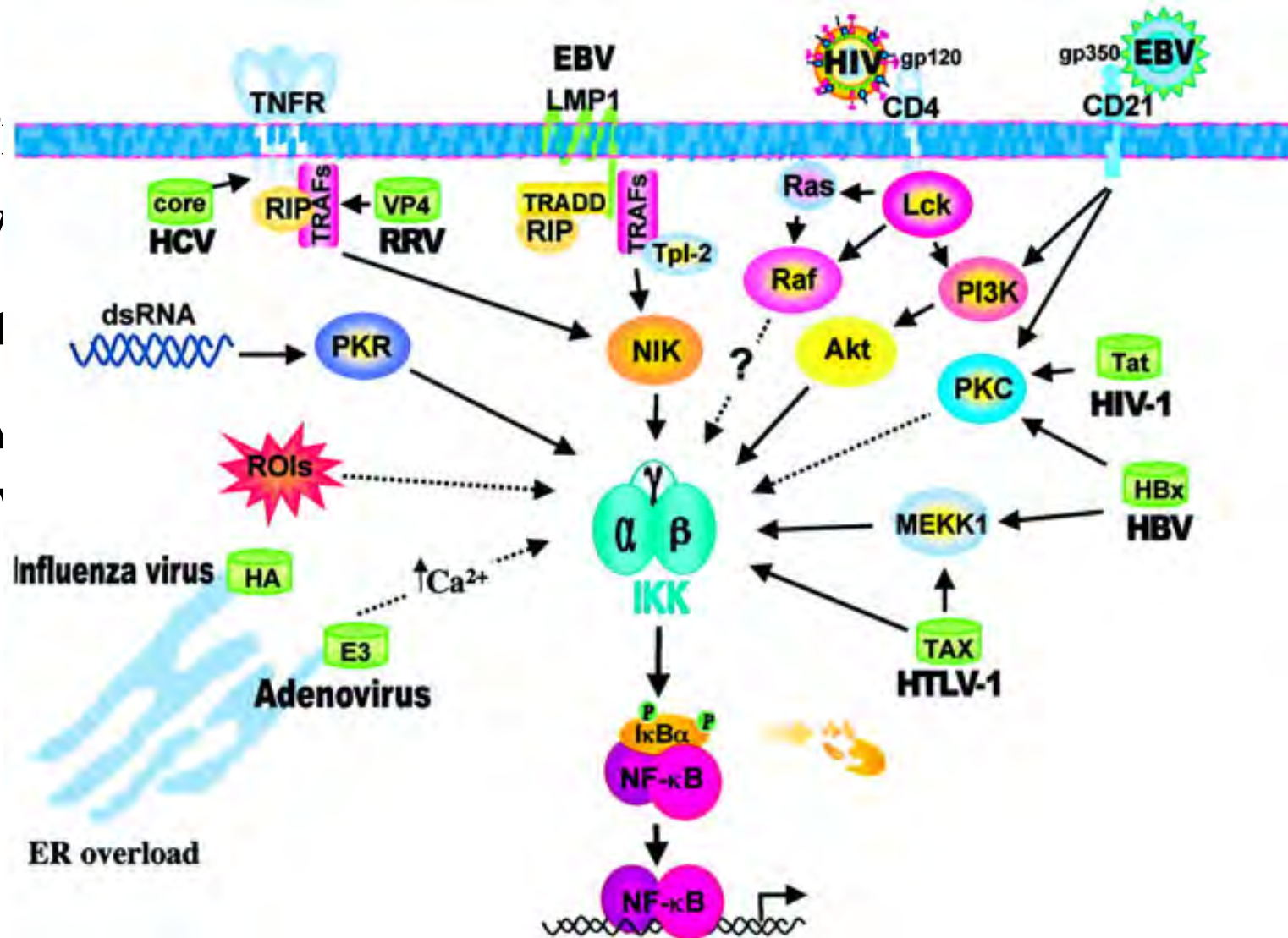


Cibles de NF- κ B

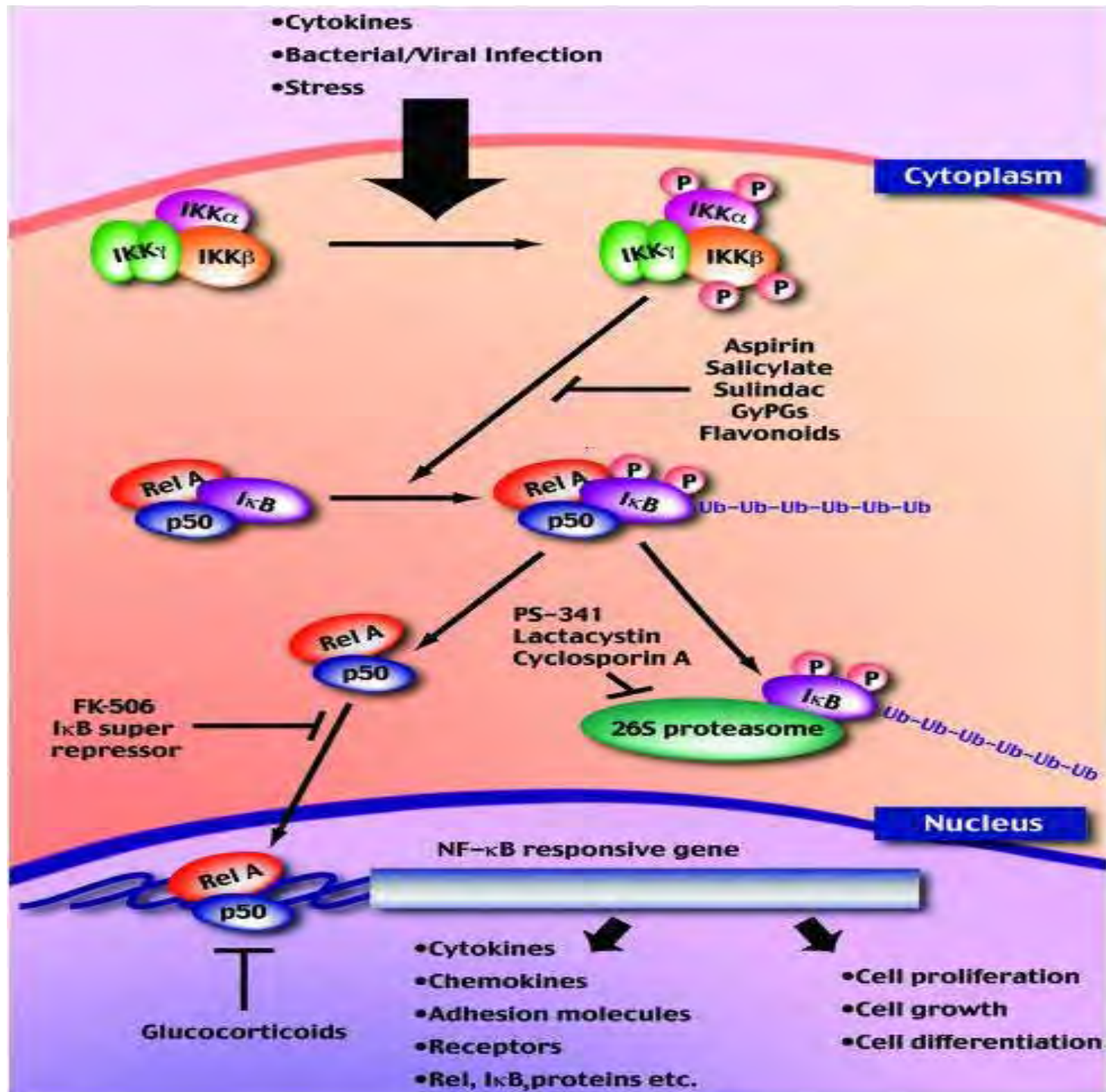
- I κ B α , I κ B ζ et MAIL
- Cytokines : TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-2, 3, 5, 6, 12, 18
- Chemokines : IL-8, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , β , γ , RANTES
- Molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1....)
- iNOS, COX-2, PLA2
- Protéines de la phase aiguë
- Gènes de survie (c-IAP, Bcl-x1...)
- Prolifération

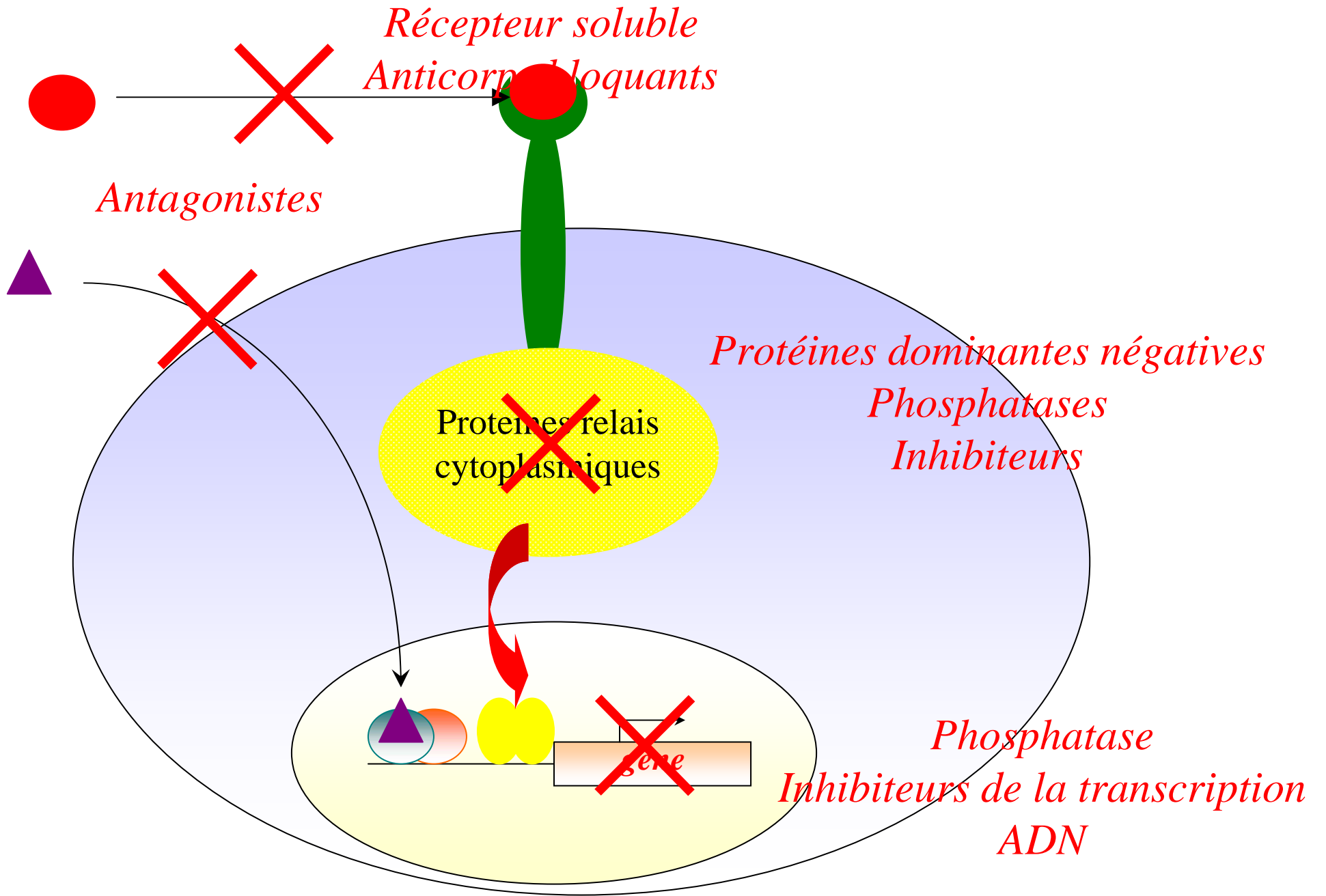
Activateurs de NF-κB

- P
- V
- C1
- A
- T



K





Méthodes d'études de la transduction du signal

- Surexpression d'une protéine
 - In vivo : transgénèse
 - In cellulo : transfection transitoire ou stable
- Extinction d'une protéine
 - In vivo : knock out
 - In cellulo :
 - » Stratégie antisens : ADN, siRNA

Cibles :

Un gène endogène

- Etude de l'expression de l'ARNm
 - Northern Blot
 - Rnase protection
 - RT-PCR
 - Etude de l'expression de la protéine : western blot
- Méthodes quantitatives, longues et délicates*

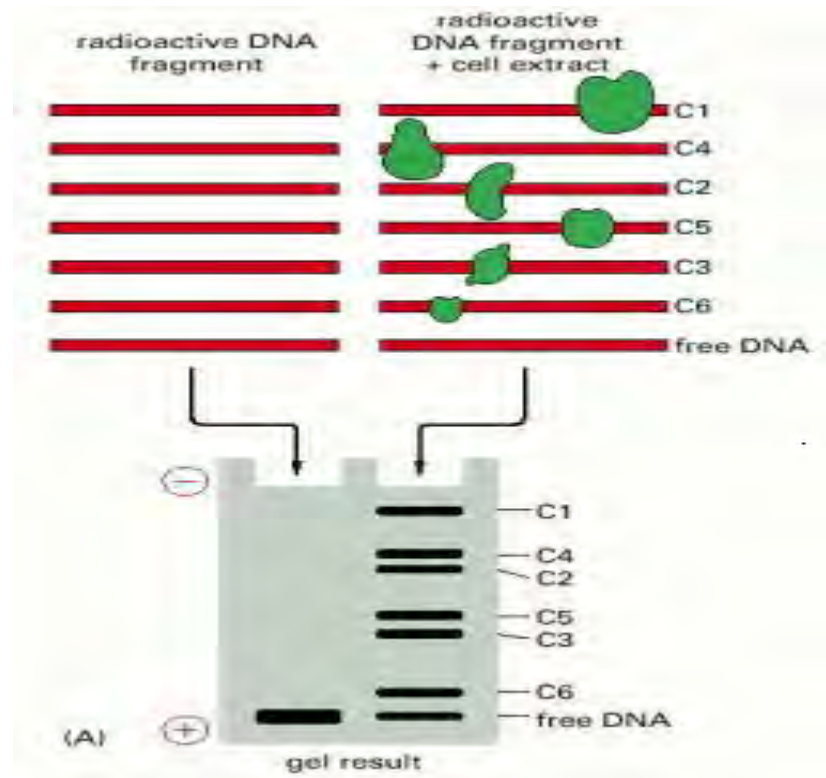
Cibles :

Un gène rapporteur

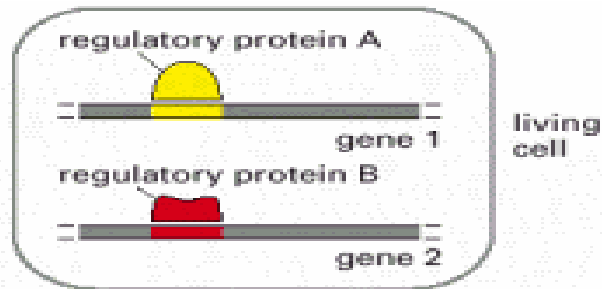
- Clonage en amont d'un gène rapporteur (luciférase, peroxydase...) des séquences 5' régulatrices d'un gène ou d'un élément de réponse
- Transfection
- Mesure de l'activité

Etude des interactions protéines/protéines

- In vitro : EMSA



- Au niveau d'un promoteur in cellulo : ChIP



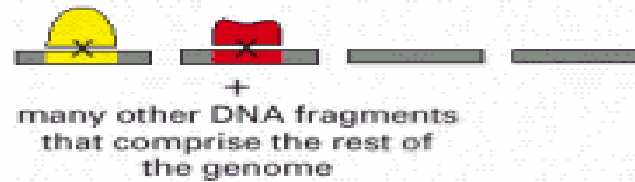
CROSS-LINK PROTEINS TO
DNA WITH FORMALDEHYDE

↓

LYSE CELLS

↓

BREAK DNA INTO SMALL
(~ 300 NUCLEOTIDE)
FRAGMENTS



PRECIPITATE DNA USING
ANTIBODIES AGAINST GENE
REGULATORY PROTEIN A



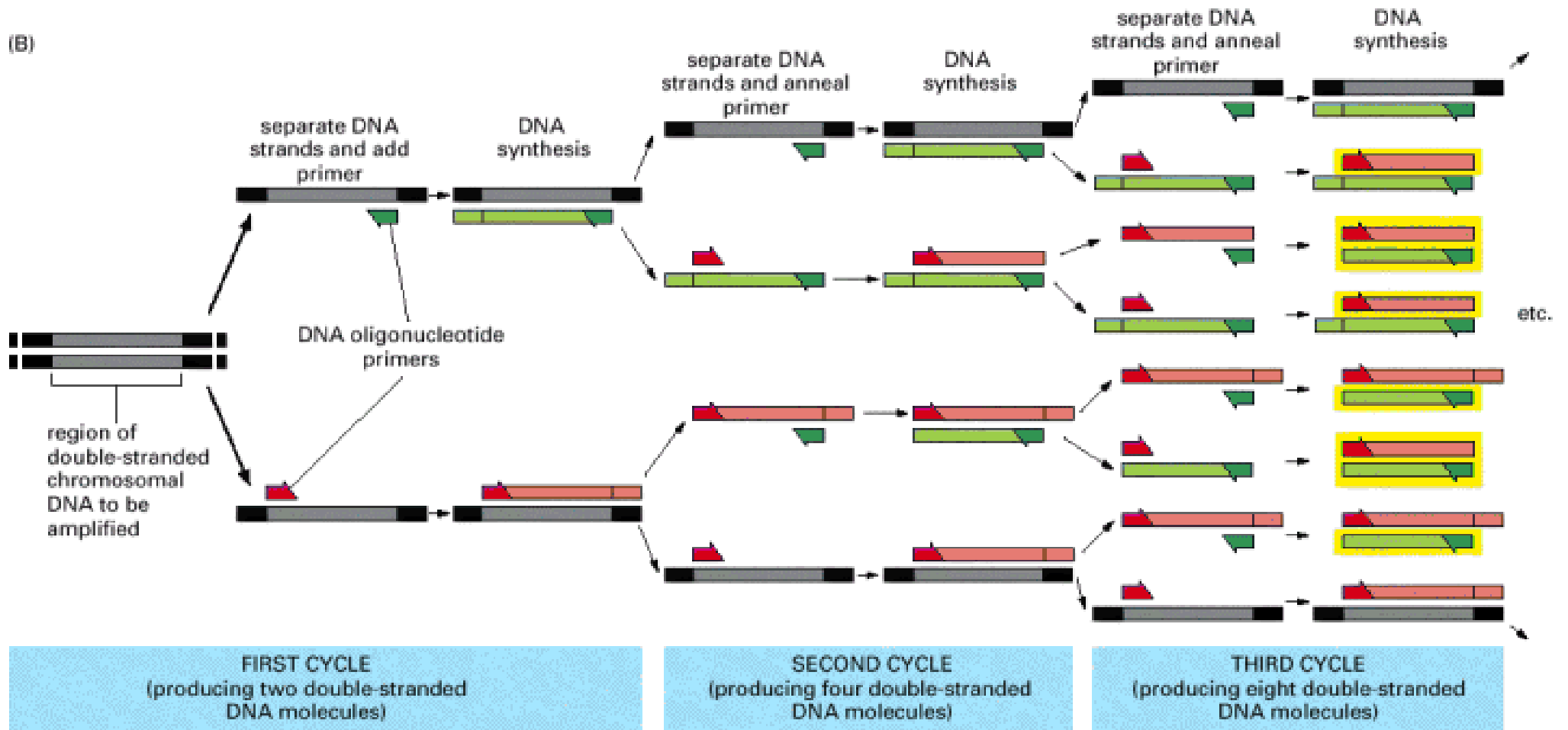
REVERSE FORMALDEHYDE
CROSSLINKS;
REMOVE PROTEIN



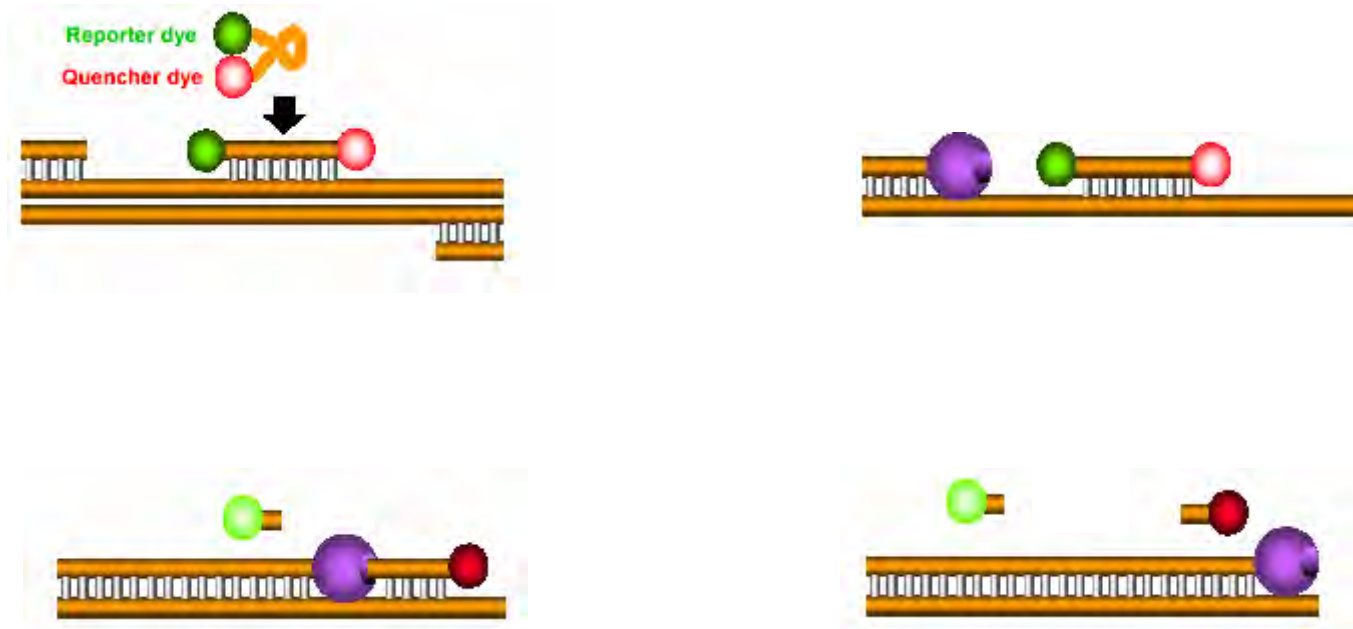
AMPLIFY THE PRECIPITATED
DNA BY PCR

DNA REPRESENTING POSITIONS
IN THE GENOME THAT WERE
OCCUPIED BY GENE REGULATORY
PROTEIN A IN THE ORIGINAL CELLS

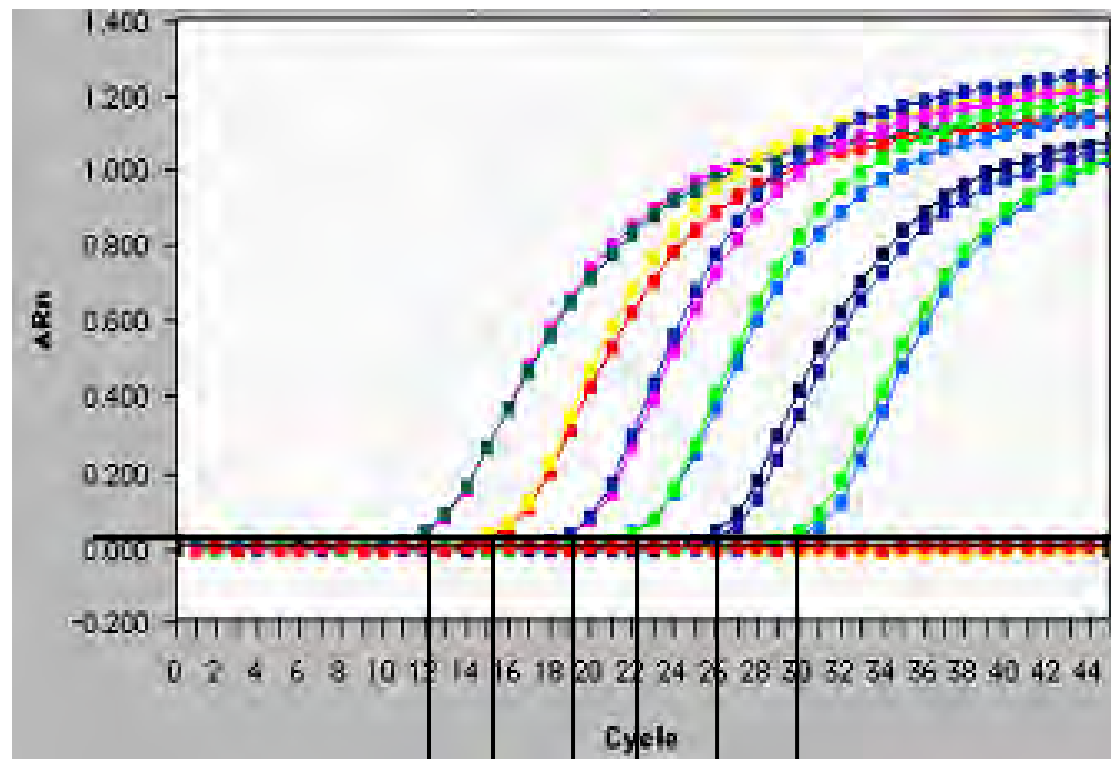
(B)



PCR quantitative

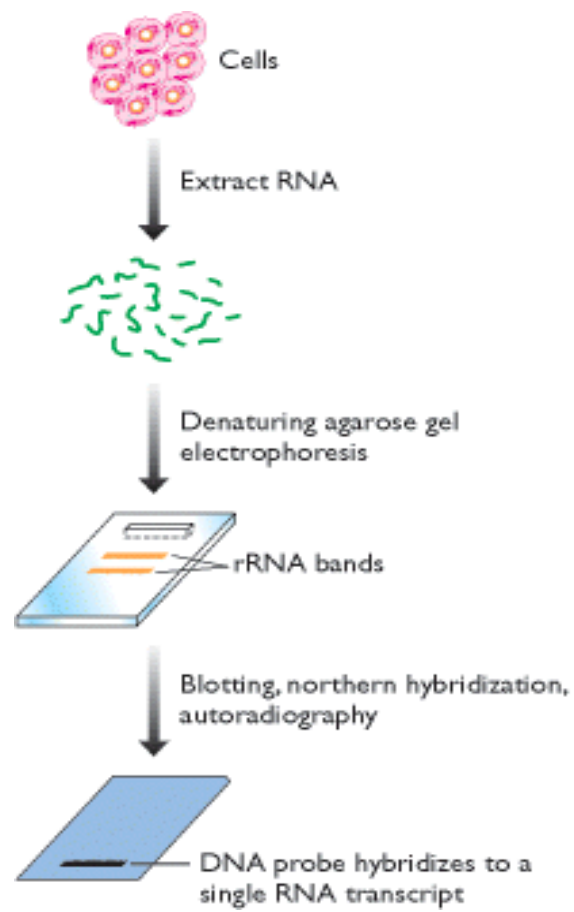


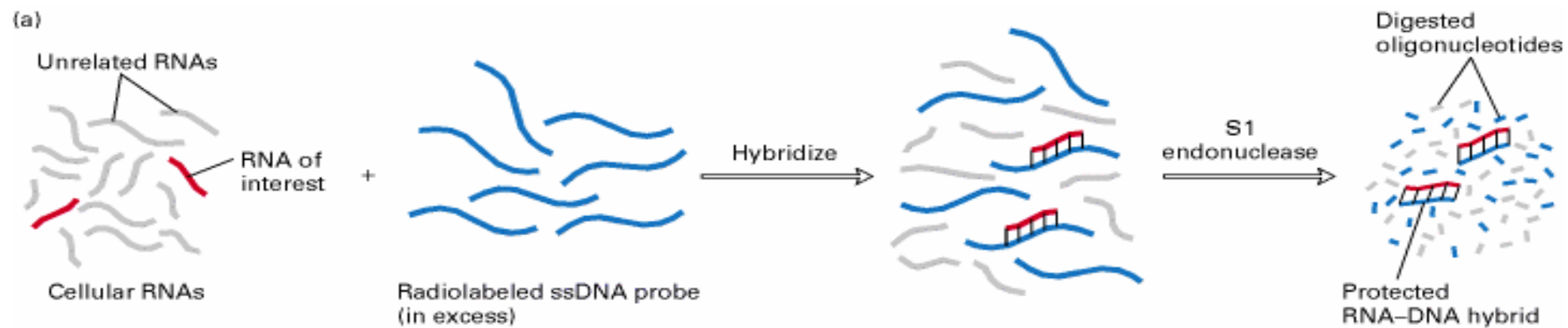
Emission de fluorescence

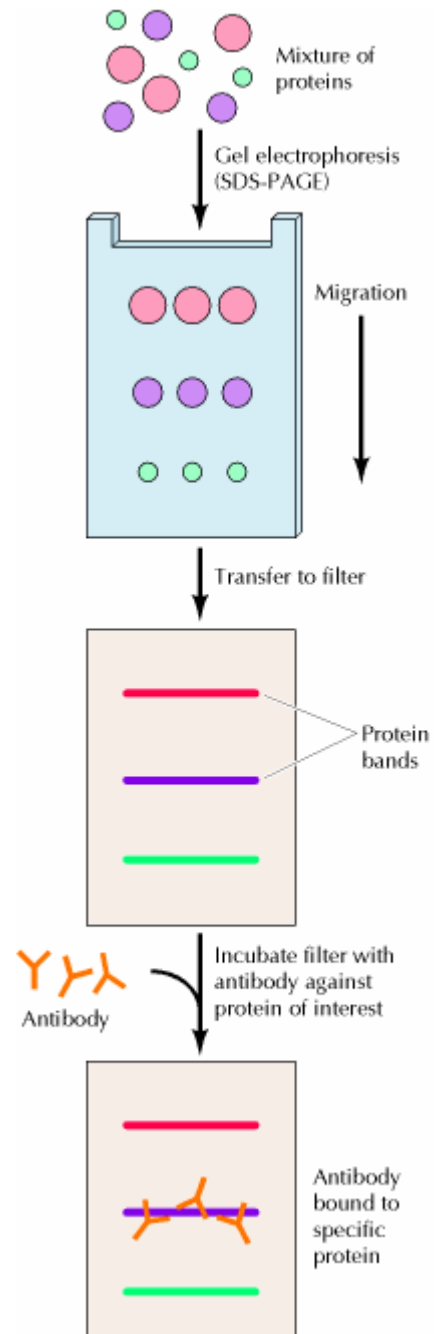


Seuil

Ct



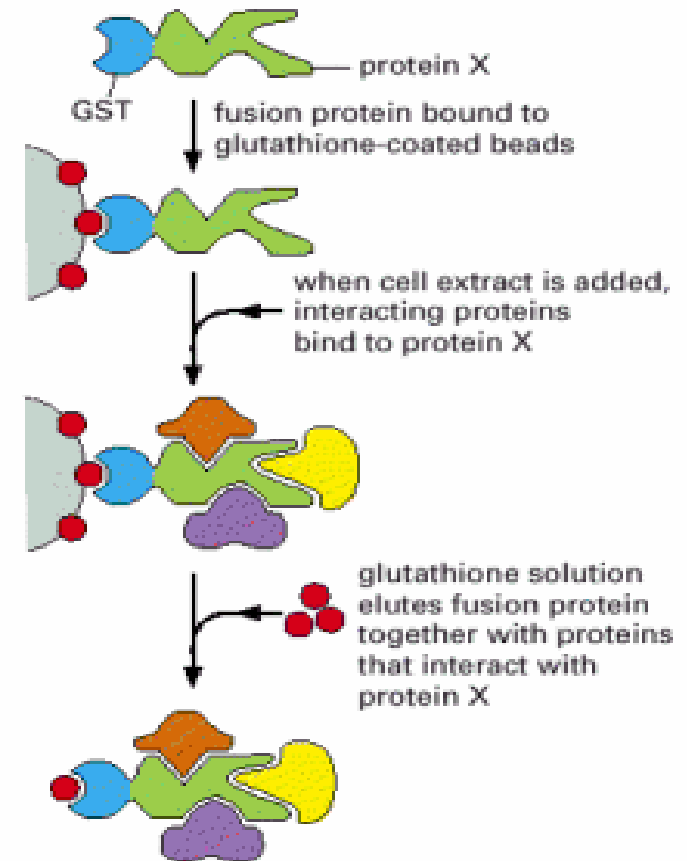


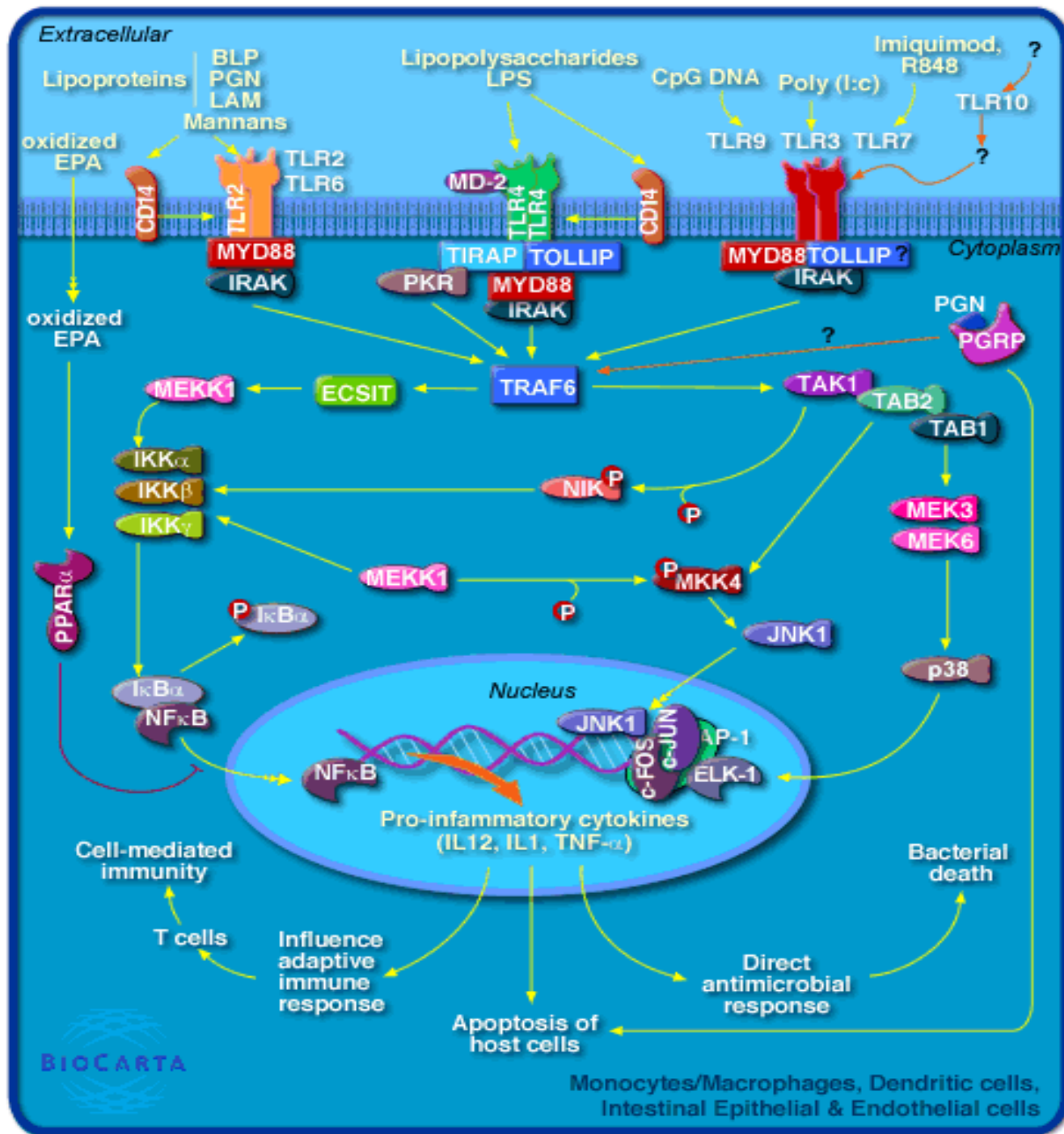


Etude des interactions protéines/protéines

- In cellulo : co-immunoprécipitation
- In vitro : GST-pull down

recombinant DNA techniques are used to make fusion between protein X and glutathione S-transferase (GST)







p38 MAPK Signaling Pathways

