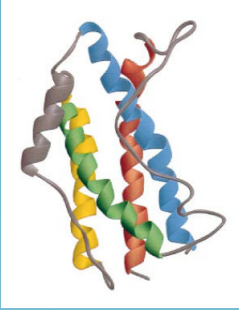


Dialogues entre les voies de signalisation de l'AMPC et celles de l'IL-1 dans la régulation de l'expression de l'IL-6 et rôle de l'IL-6 dans les thyrocytes et dans les cardiomyocytes de rats

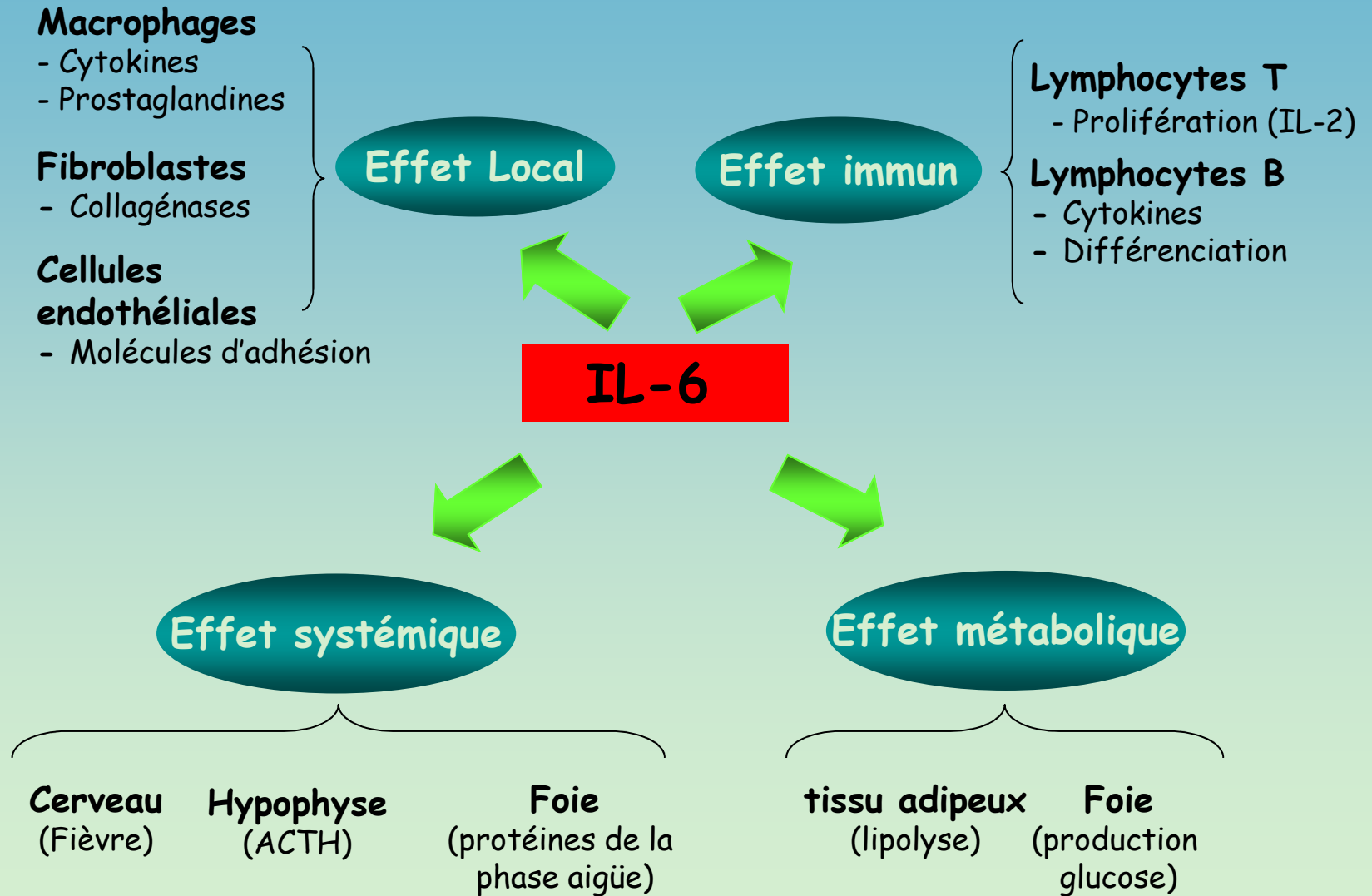
Nicolas Szabo-Fresnais



L'interleukine-6 (IL-6)

- Cytokine pro-inflammatoire
- Clonage du gène humain de l'IL-6 en 1986 (Hirano et coll.)
 - participe à la réponse immunologique: B cell stimulatory factor-2
- Membre des cytokines de la famille IL-6 qui contient:
 - LIF (leukaemia inhibitory factor)
 - IL-11
 - CT-1 (cardiotrophin 1),
 - CLC (cardiotrophin-like-cytokine)
 - OSM (oncostatin M)
 - CNTF (ciliary neurotrophic factor)
- Homologie séquence: Homme Rat: 68% (ARNm) et 58% (protéine).
- Synthèse dépendante d'autres cytokines (IL-1, TNF α , IFN γ).

Effets cellulaires de l'IL-6



L'IL-6 dans les tissus pathologiques thyroïdiens et cardiaques humains

➤ Tissus thyroïdiens

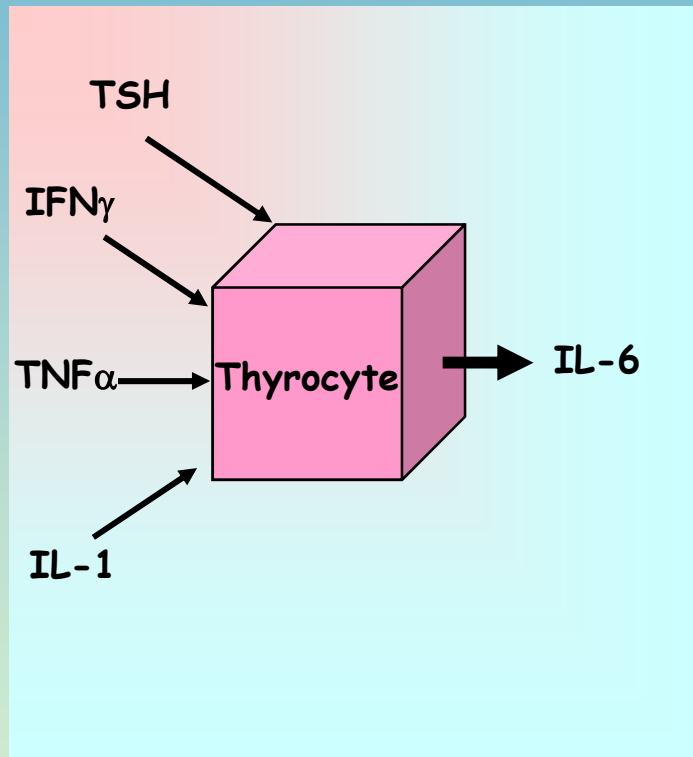
Maladie de Basedow
Thyroidite de Hashimoto
Adénome folliculaire
Carcinome papillaire

➤ Tissus cardiaques

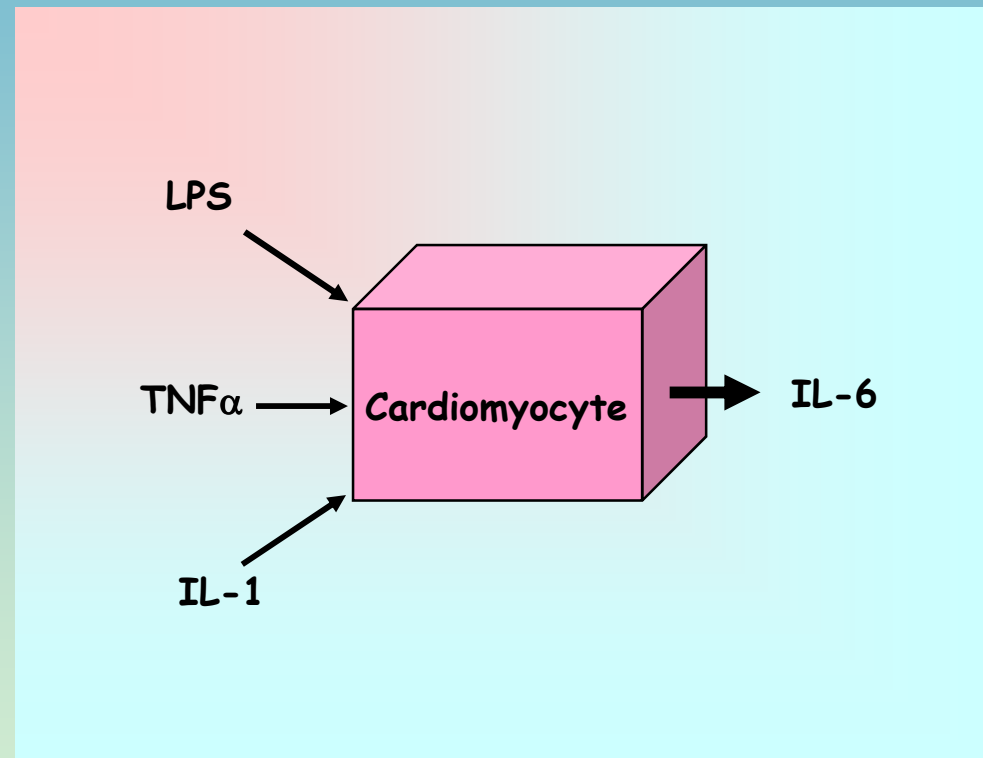
Infarctus du myocarde
Ischémie

Kayser et coll (1995) Autoimmunity
Kaneko et coll (1997) Res Commun Mol Pathol Pharmacol
Plenz et coll (2002) JACC
Gabrielsen et coll (2007) JMCC

Les cellules thyroïdiennes et les cardiomyocytes produisent de l'Interleukine-6

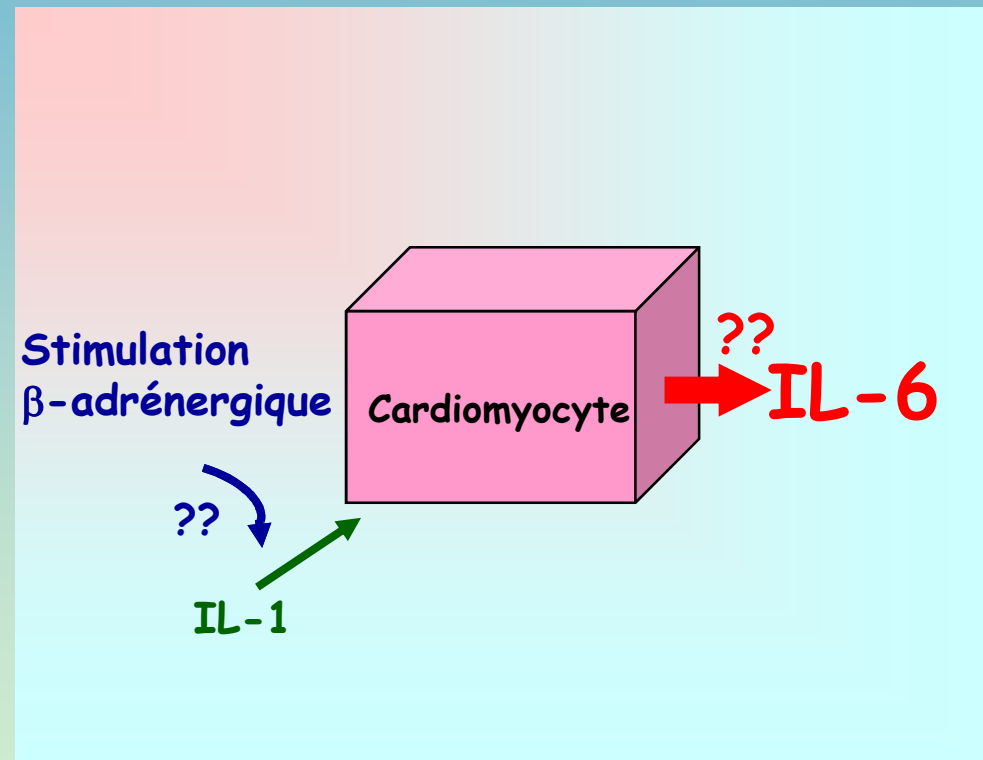
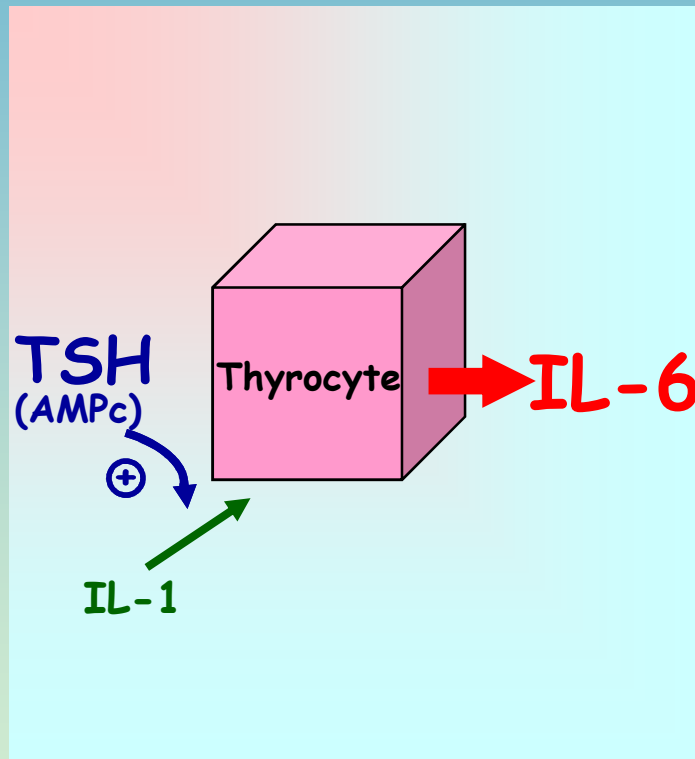


Weetman et coll., J Endocrinol (1990)
Diamant et coll., Autoimmunity (1991)
Kennedy et coll., J Endocrinol (1992)
Iwamoto et coll., Cytokine (1991)



Ancey et coll., Cytokine (2002)
Gwechenberger et coll. Circulation (1990)
Briest et coll. Eur J Physiol (2003)

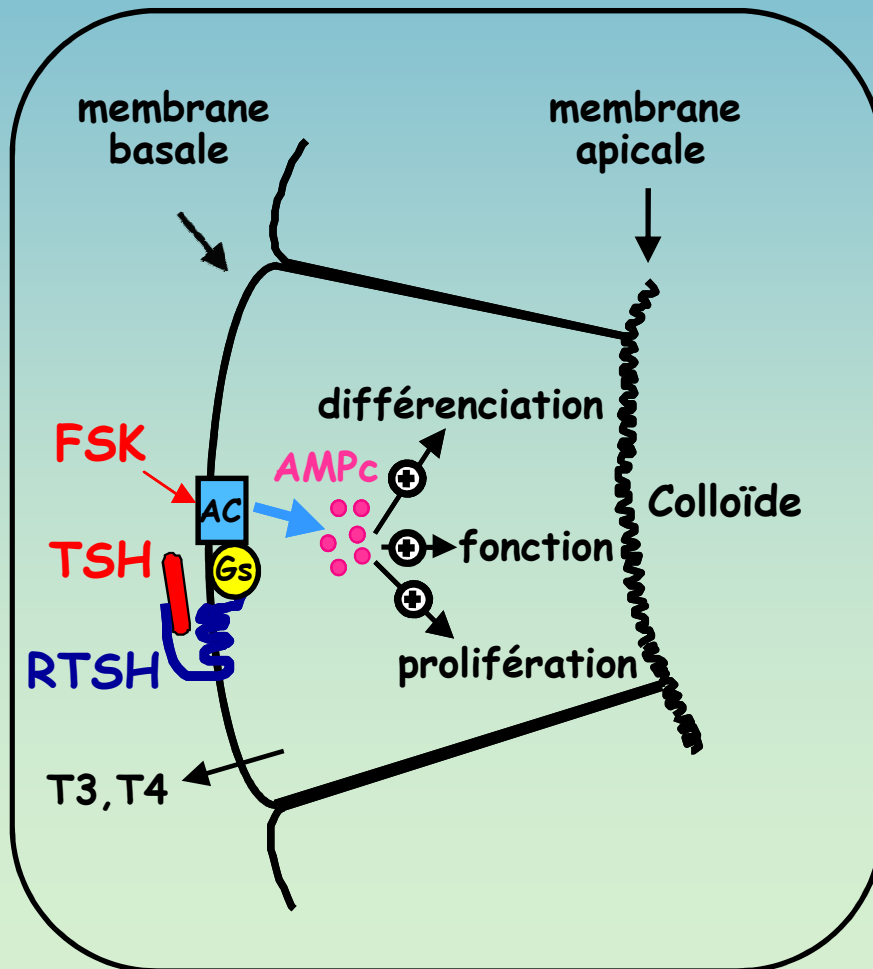
Effet synergique de l'AMPC sur la production de l'IL-6 stimulée par l'IL-1: un nouveau mode de régulation?



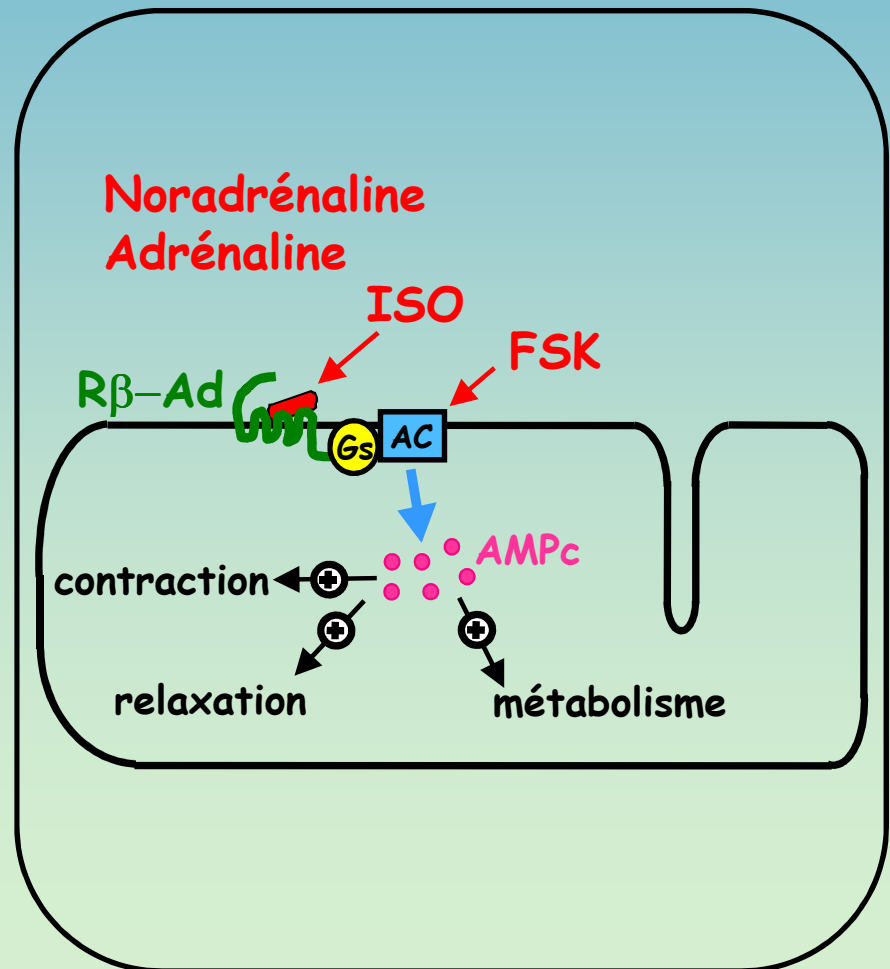
Iwamoto et coll., Cytokine (1991)

La voie de l'AMPc

dans le thyrocyte



dans le cardiomyocyte



Dérégulation de la voie de l'AMPc

Thyroïde:

Production d'AMPc en continu par:

- . TSAb (maladie de Basedow)
- . Mutations du RTSH
- . Mutations de G_s

→ Hyperthyroïdie

Cœur:

Activation chronique des récepteurs β -ad:

- . Remodelage cardiaque

→ insuffisance cardiaque

rôle des cytokines pro-inflammatoires?

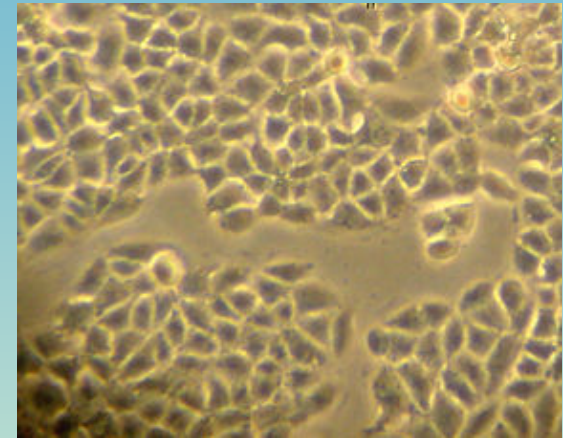
Objectifs généraux

- Dérégulation de la voie de l'AMPc et dialogue avec les cytokines pro-inflammatoires
 - réponse cellulaire (production d'IL-6)
- Rôle de l'IL-6 dans le remodelage cardiaque
 - hypertrophie

Modèles cellulaires

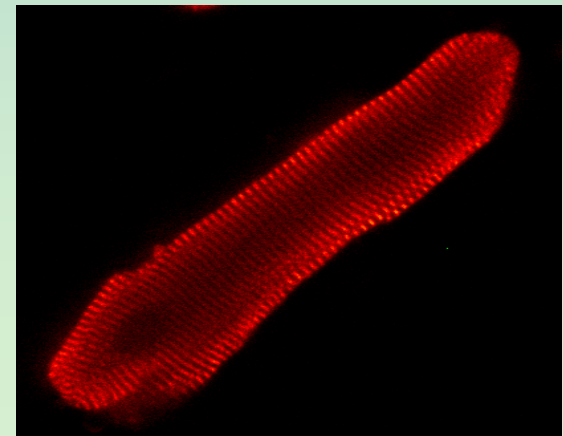
Lignée cellulaire de thyrocytes de rats: les cellules FRTL-5

- . Cellules non-transformées, non-polarisées
- . Expriment des marqueurs de différenciation du thyrocyte (Tg, NIS, TPO)
- . Croissance cellulaire dépendante de la TSH et de l'IGF-1/insuline



Cultures primaires de cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes

- . Cellules hautement différenciées
- . Répondent aux catécholamines



Plan de l'exposé

- 1) Dialogues entre les voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc dans la production de l'IL-6
- 2) Mécanismes de régulations de la synergie au niveau de la stabilité de l'ARNm et au niveau transcriptionnel
- 3) Voies de signalisation activées par l'IL-6 et par le mécanisme de « trans-signaling » dans les cardiomyocytes
- 4) « Trans-signaling » et induction de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque
- 5) Conclusions-Perspectives

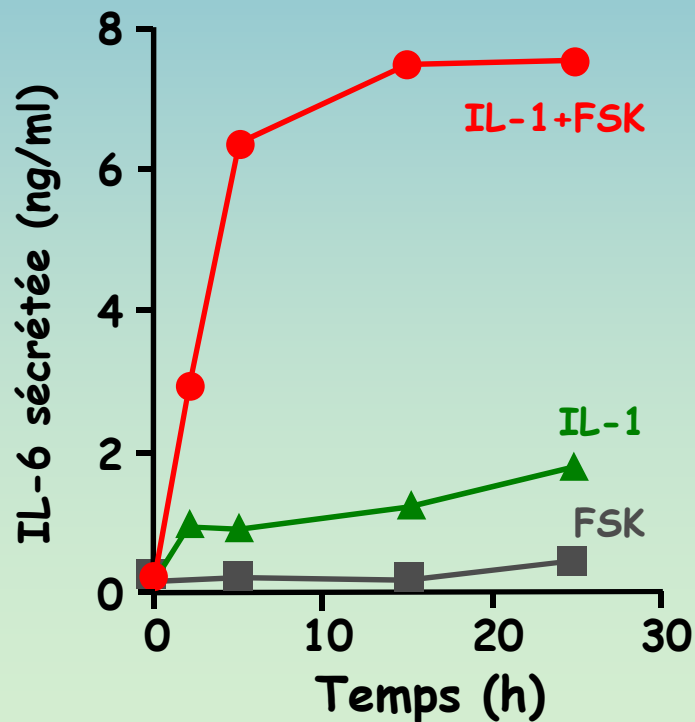
Plan de l'exposé

- 1) Dialogues entre les voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc dans la production de l'IL-6
- 2) Mécanismes de régulations de la synergie au niveau de la stabilité de l'ARNm et au niveau transcriptionnel
- 3) Voies de signalisation activées par l'IL-6 et par le mécanisme de « trans-signaling » dans les cardiomyocytes
- 4) « Trans-signaling » et induction de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque
- 5) Conclusions-Perspectives

Effet d'agents qui stimulent la production de l'AMPc sur la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-1

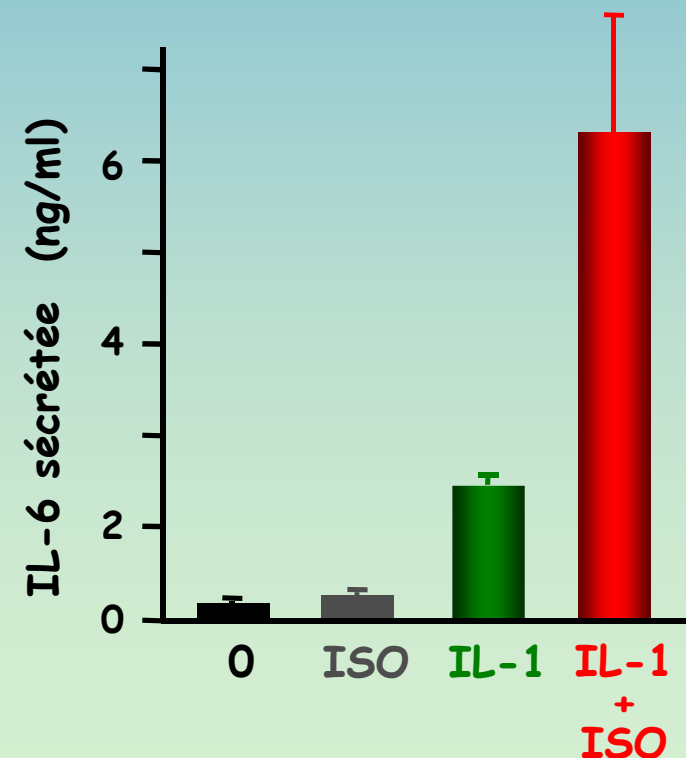
Cellules FRTL-5

Dosage ELISA



Cardiomyocytes

16h de stimulation



Effet de la production d'AMPc sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6 stimulée par l'IL-1

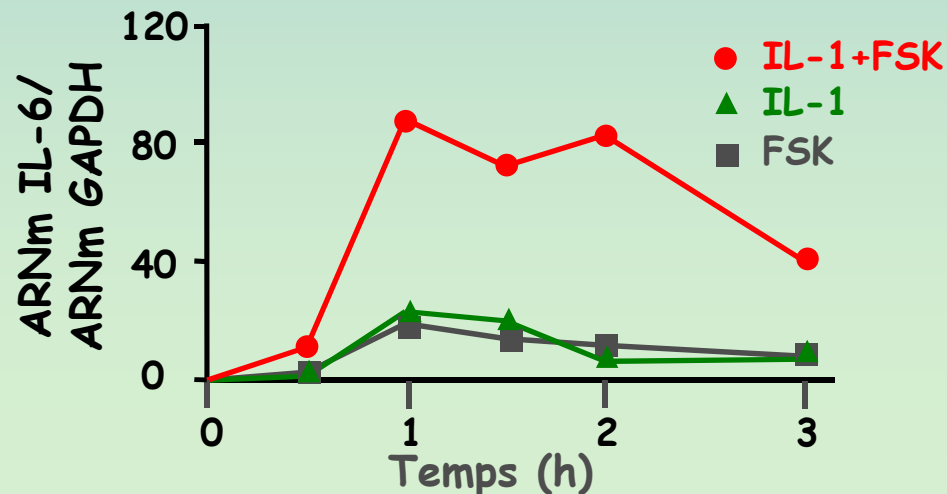
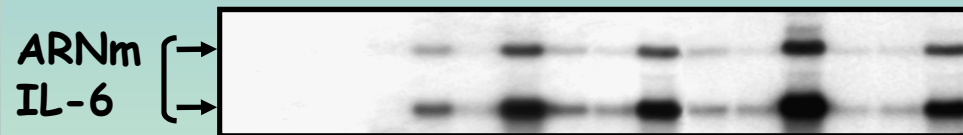
Cellules FRTL-5

Northern blot

Temps (h): 0 0,5 1 1,5 2 3

IL-1: - + - + + - + + - + + - + + - +

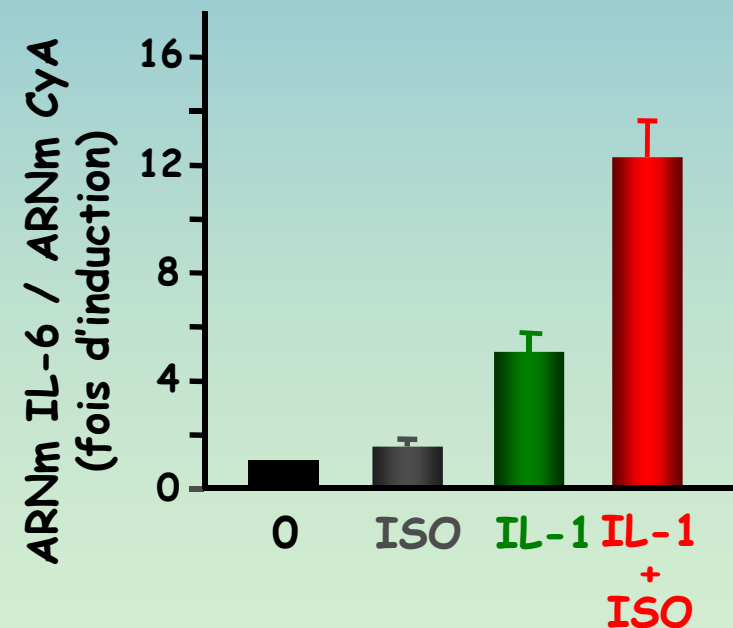
FSK: - - + + - + + - + + - + + - + +



Cardiomyocytes

RT-PCRq

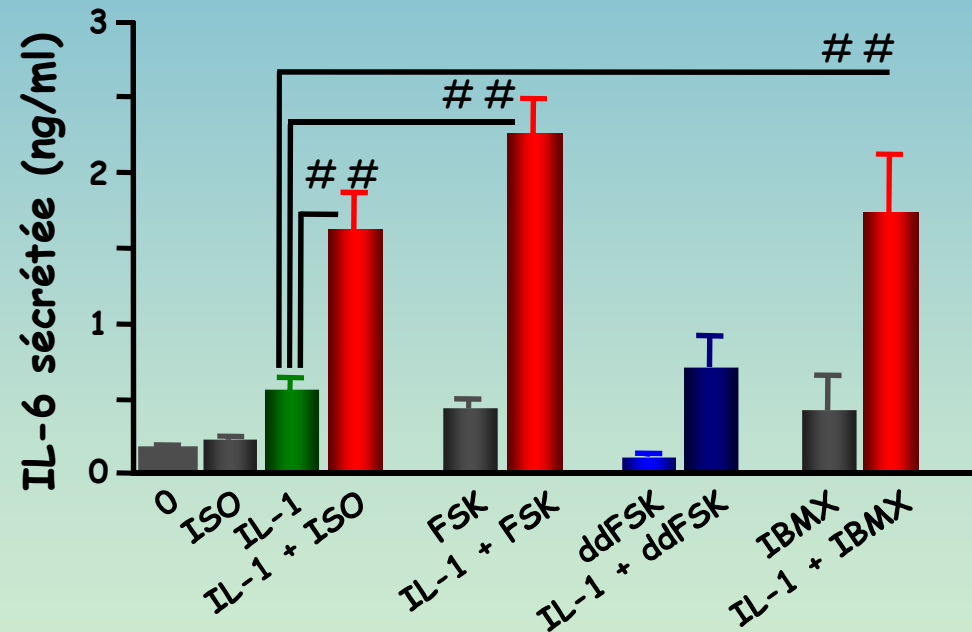
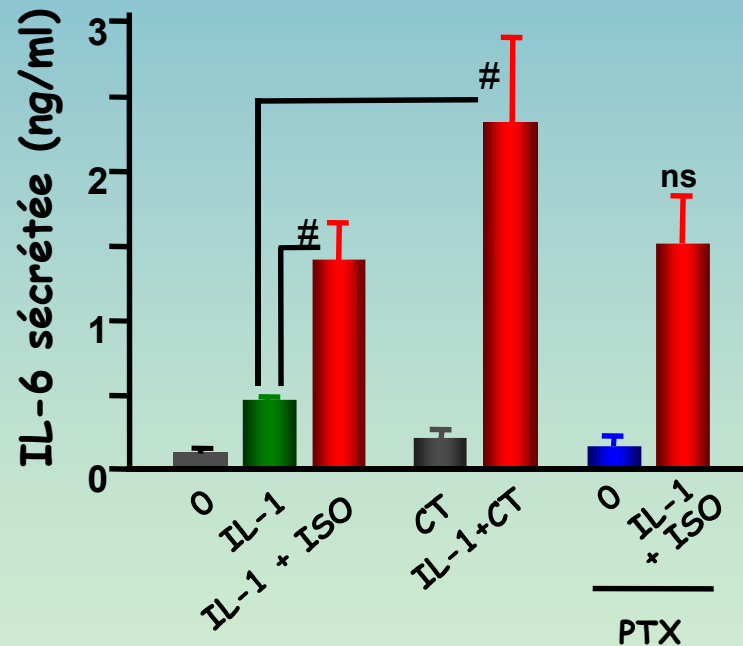
stimulation: 4h



Rôle de la voie Gs/AMPC dans l'effet synergique IL-1/ISO sur la sécrétion de l'IL-6

Cardiomyocytes

Dosage ELISA



CT: toxine cholérique (stimule Gs)
PTX: toxine pertussique (inhibe Gi)

ddFSK: analogue inactif de la FSK
IBMX: inhibiteur non-spécifique
des phosphodiéstrases

Les cibles de l'AMPc

N6- Monobutyl-AMPc

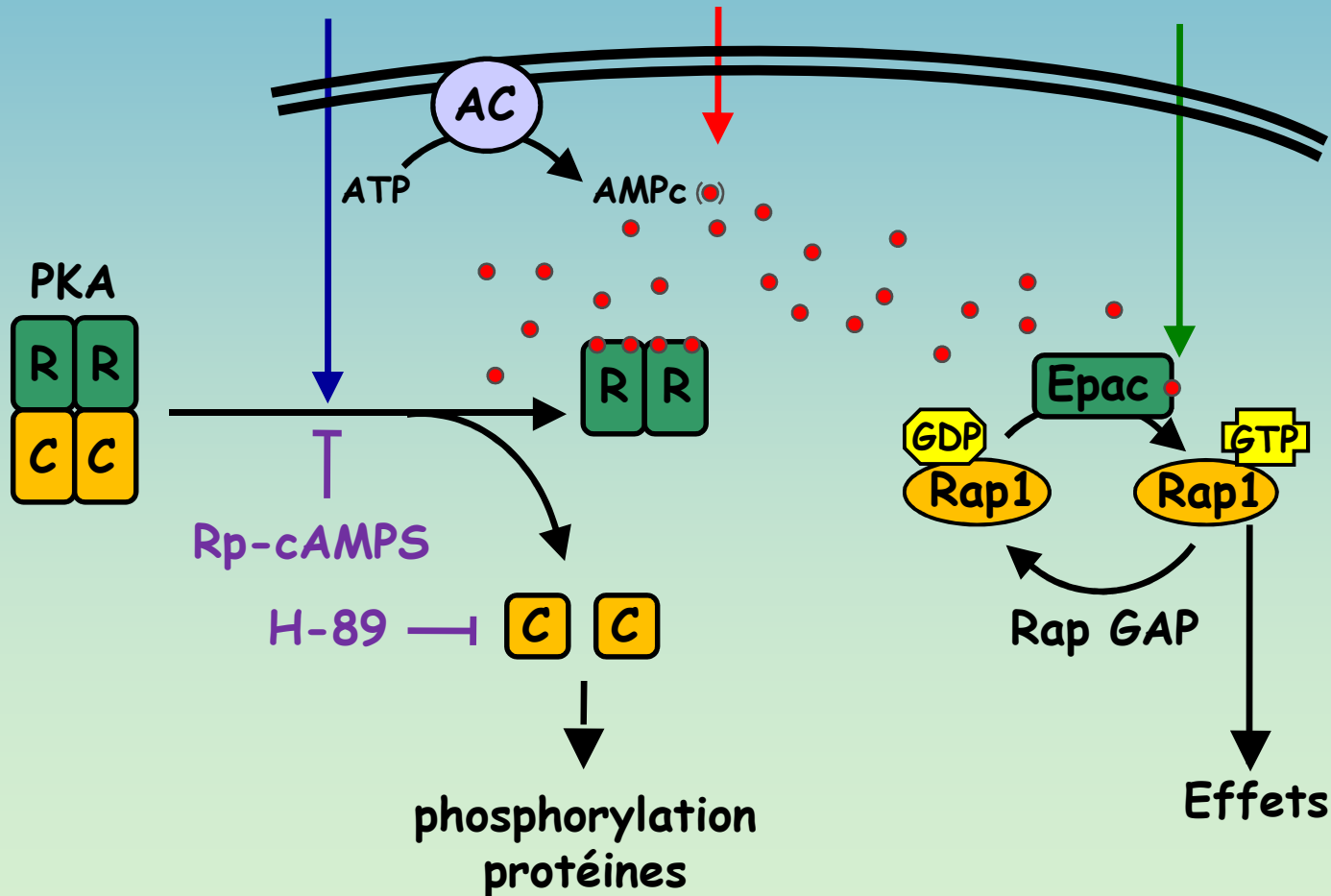
8-Chlorophenylthio-AMPc

8-CPT-2'-O-Me-cAMP

MB-AMPc

CPT-AMPc

Me-AMPc

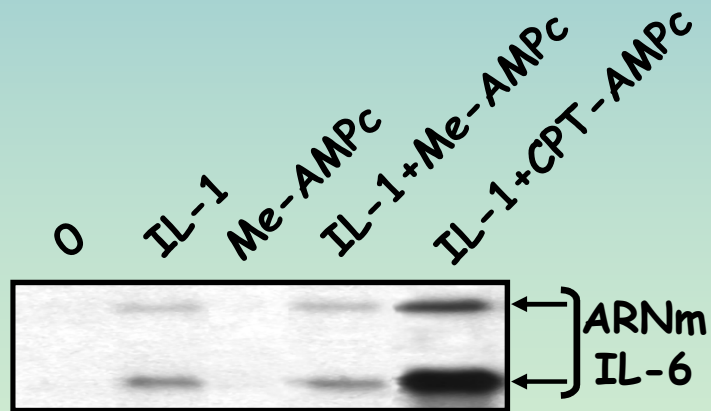


Effet de l'activation des voies de l'AMPC sur la régulation de l'IL-6 par l'IL-1

Cellules FRTL-5

stimulation 2h

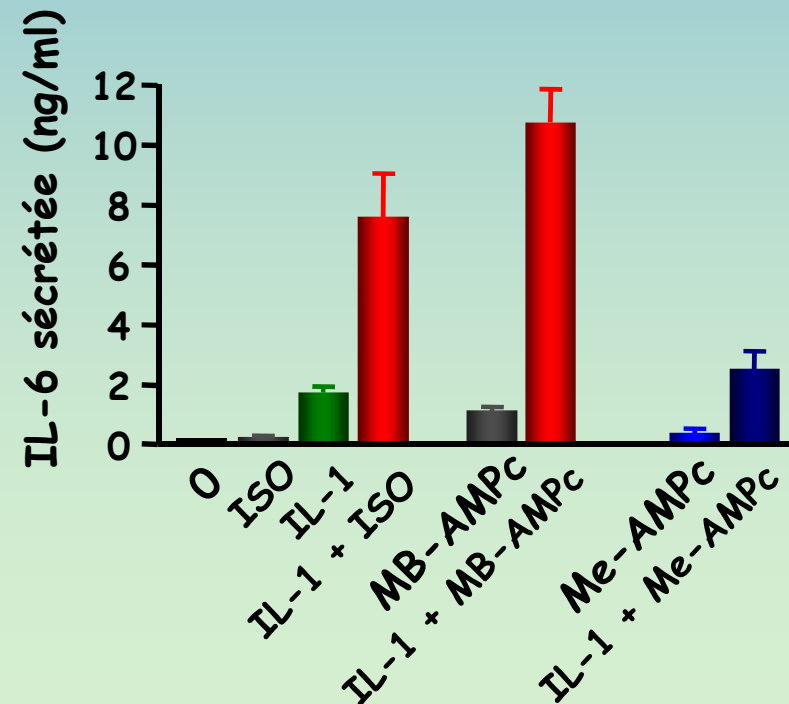
Northern blot



Cardiomyocytes

stimulation 16h

Dosage ELISA

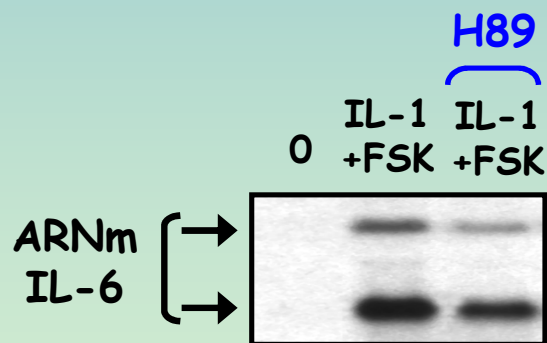


Effet de l'inhibition de la PKA sur la régulation de l'IL-6 par l'IL-1

Cellules FRTL-5

Pré-traitement 2h
stimulation 2h

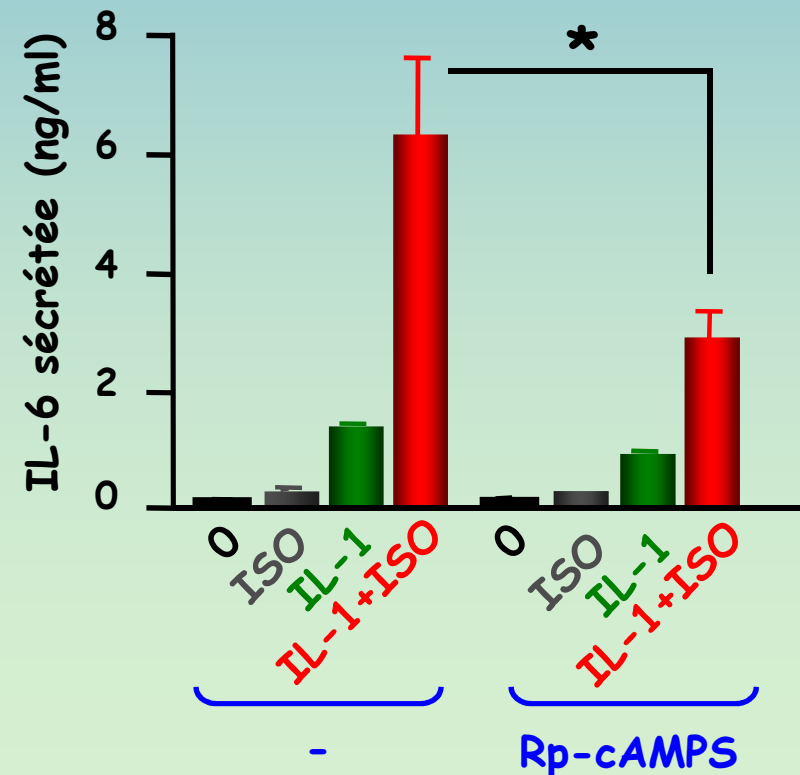
Northern blot



Cardiomyocytes

Pré-traitement 2h
stimulation 16h

Dosage ELISA



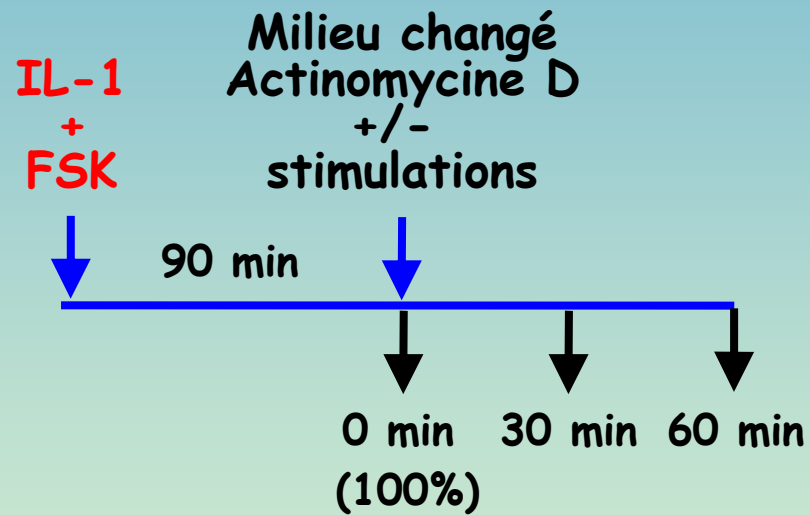
Conclusion 1

- . La production d'IL-6 par l'IL-1 est augmentée de manière synergique par l'AMPc
- . Cet effet synergique implique l'expression de l'ARNm de l'IL-6
- . L'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA participe à cet effet synergique

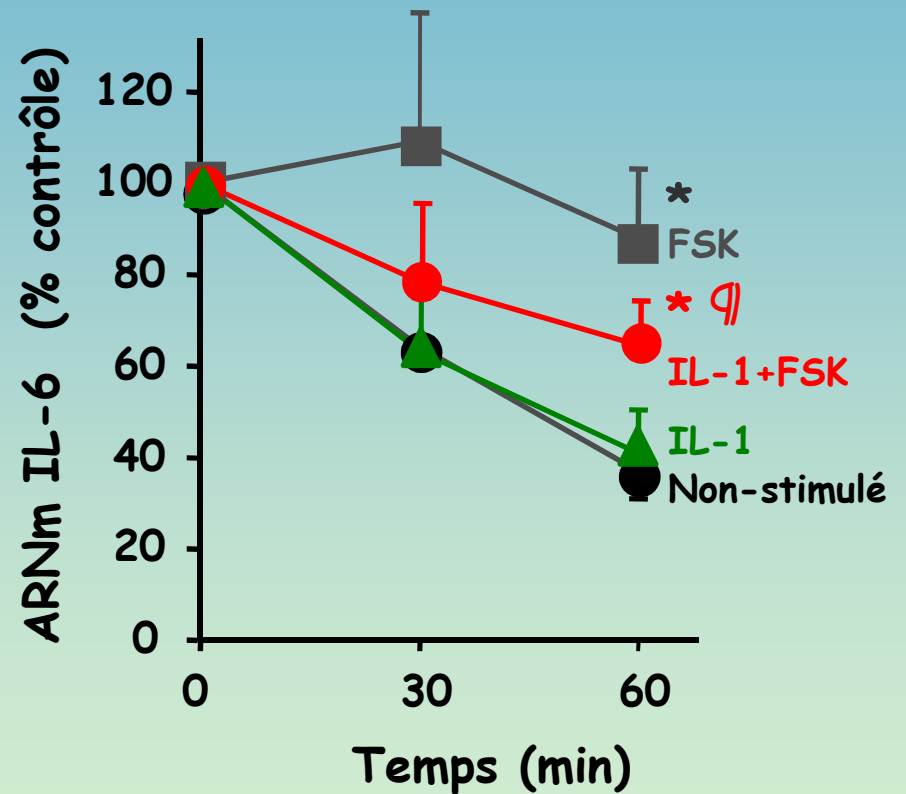
Plan de l'exposé

- 1) Dialogues entre les voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc dans la production de l'IL-6
- 2) Mécanismes de régulations de la synergie au niveau de la stabilité de l'ARNm et au niveau transcriptionnel
- 3) Voies de signalisation activées par l'IL-6 et par le mécanisme de « trans-signaling » dans les cardiomyocytes
- 4) « Trans-signaling » et induction de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque
- 5) Conclusions-Perspectives

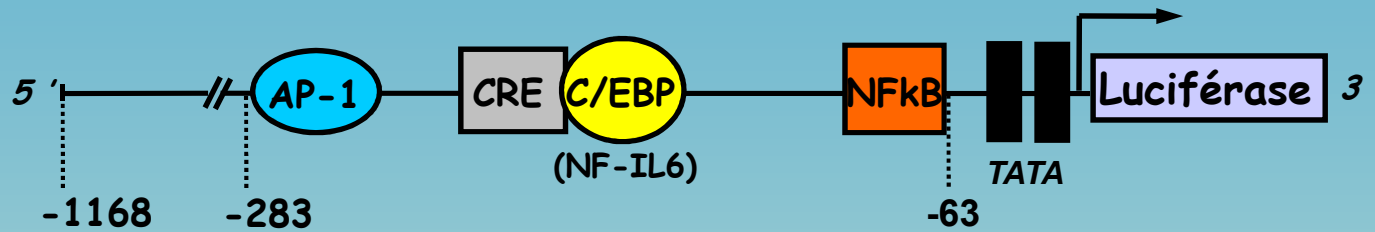
Etude de la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules FRTL-5



- ARN
- Northern blot



Promoteur du gène de l'IL-6 et mesure de l'activité transcriptionnelle



Cellules FRTL-5

Transfection cellulaire transitoire

Co-transfection
Plasmide rapporteur luciférase
Plasmide contrôle β -galactosidase

↓ 24h

Déprivation

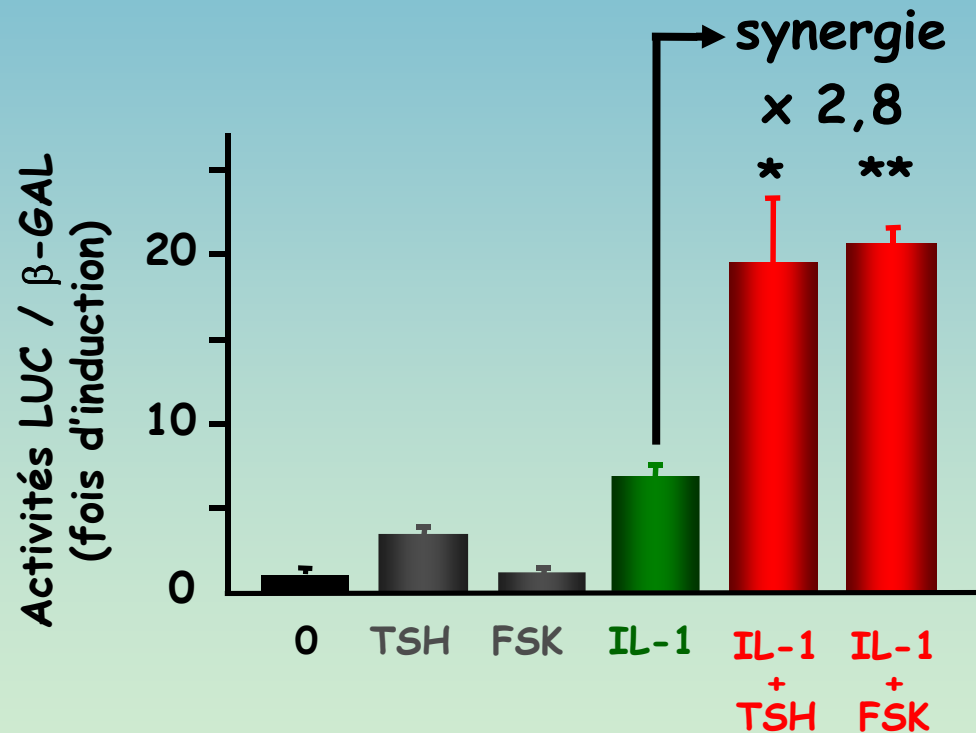
↓ 24h

Stimulations

↓ 7h

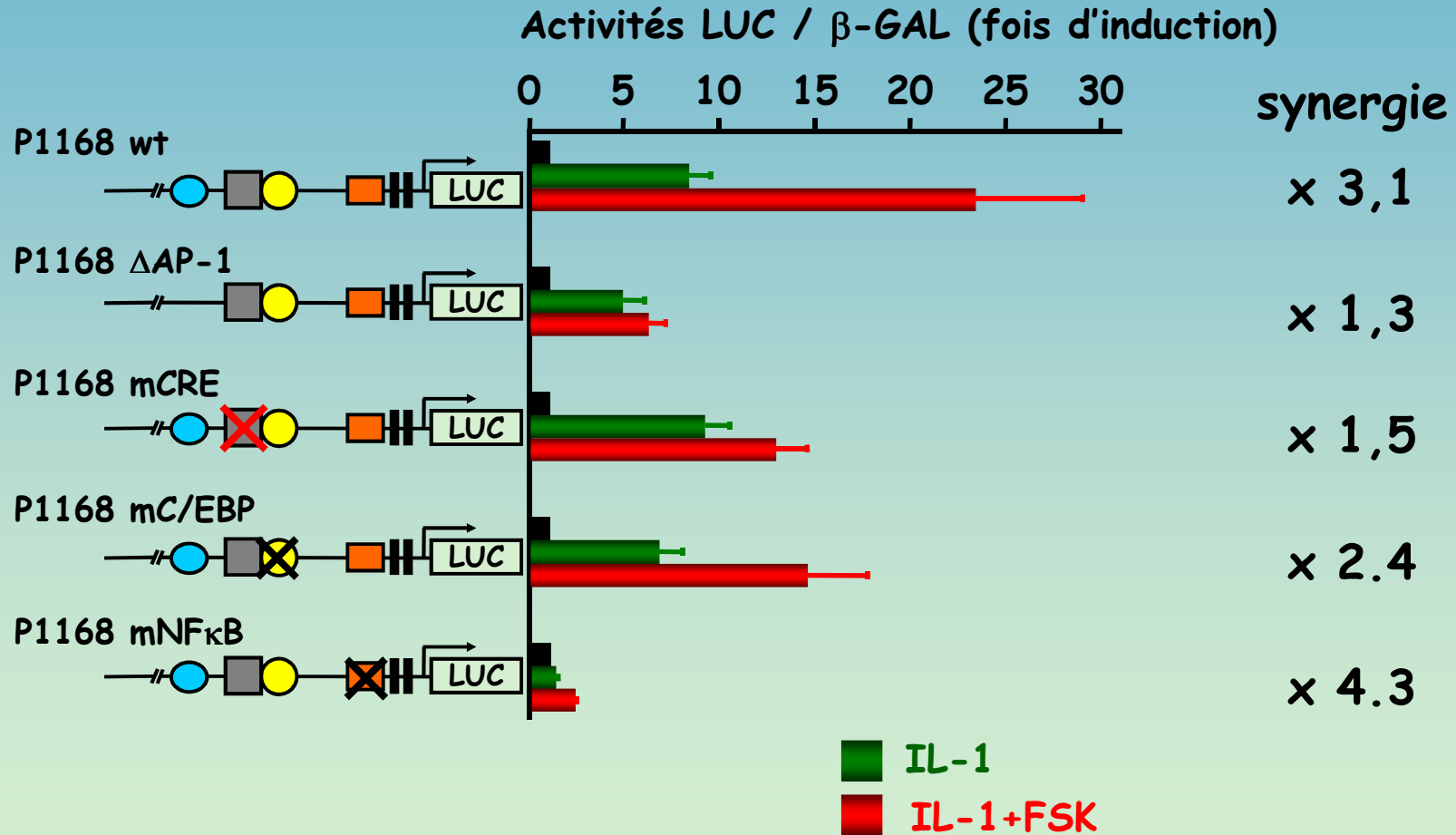
Activités luciférase et β -galactosidase

Activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6 dans les cellules FRTL-5



* / ** Significatif par rapport IL-1

Effet de l'invalidation des sites du promoteur de l'IL-6 sur l'effet synergique IL-1/FSK



Effet de la synergie sur la liaison des facteurs de transcription sur les sondes AP-1 et CRE

**Retard sur gel
EMSA**

Cellules FRTL-5

- . stimulation 1h
- . extraits nucléaires
- . Incubation sondes

CRE*+/-CRE
5'...GGACGTCA...3'

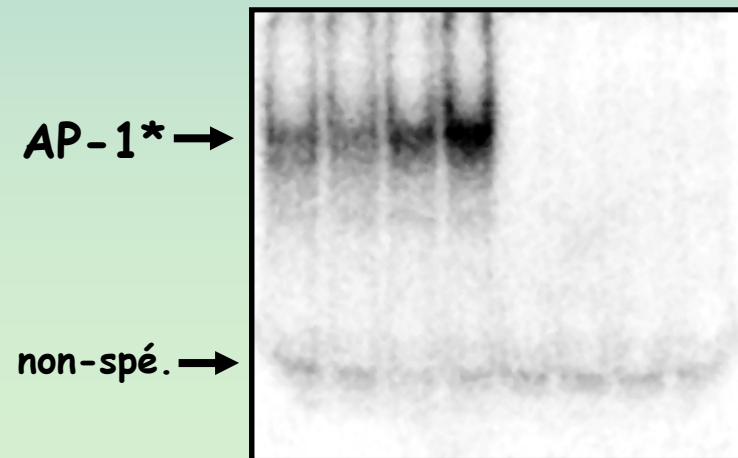
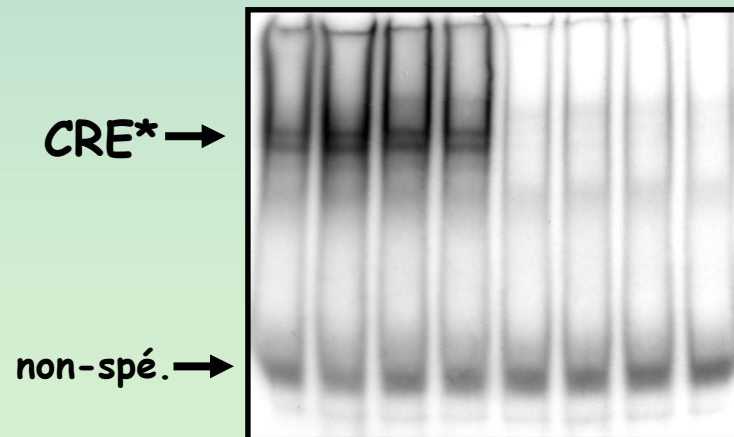
AP-1*+/-AP-1
5'...TGAGTCA...3'

CRE

AP-1

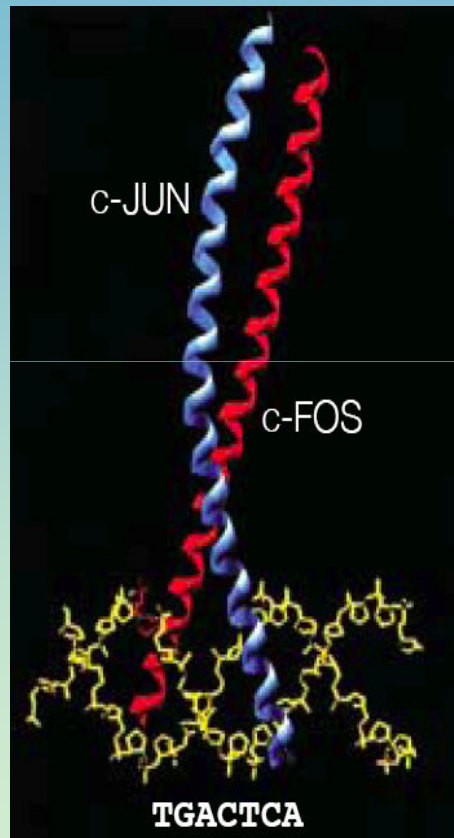
0 FSK IL-1 IL-1+FSK
0 FSK IL-1 IL-1+FSK

0 FSK IL-1 IL-1+FSK
0 FSK IL-1 IL-1+FSK



Les facteurs de transcription AP-1 et CREB

- . Appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription b-ZIP (leucine zipper factor)
- . Forment des homo ou des hétérodimères



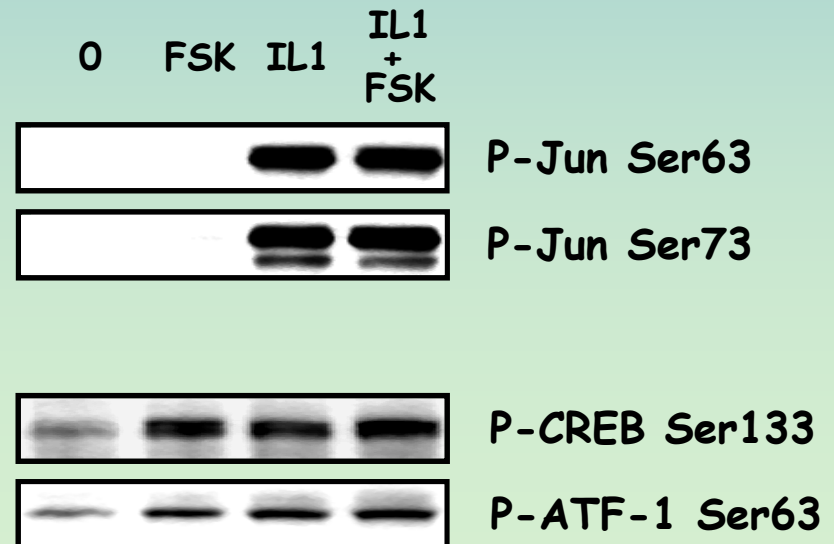
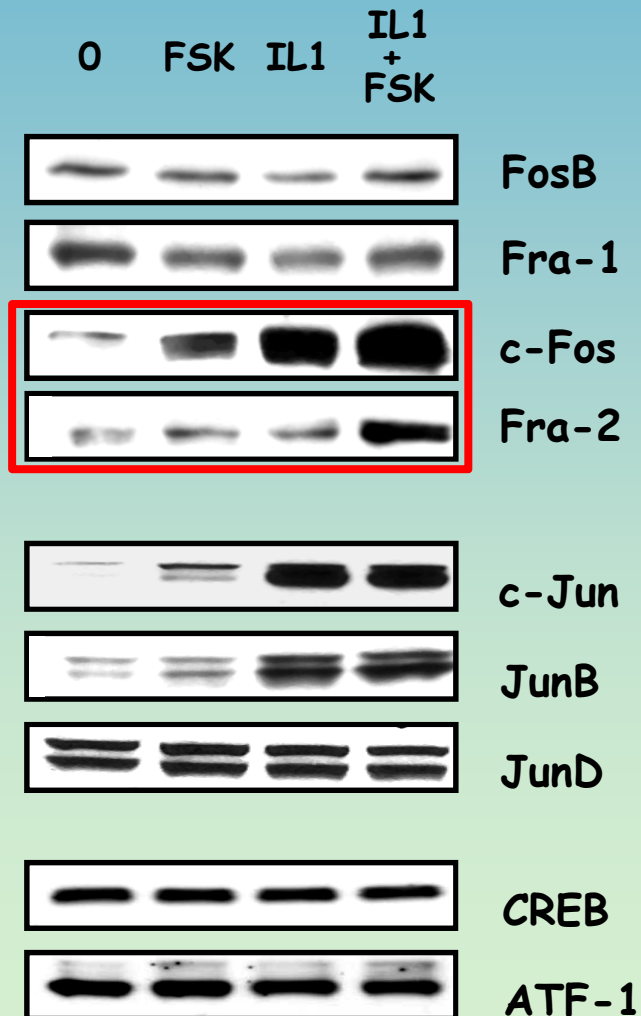
<u>Jun:</u>	<u>Fos:</u>	<u>CREB:</u>
c-Jun	c-Fos	CREB
JunB	Fra1	ATF1
JunD	Fra2	
	FosB	

Stimulation transcription par les hétérodimères Jun-Fos est plus forte que celle des homodimères Jun-Jun.

Expression et activation des facteurs de transcription AP-1 et CREB

Cellules FRTL-5

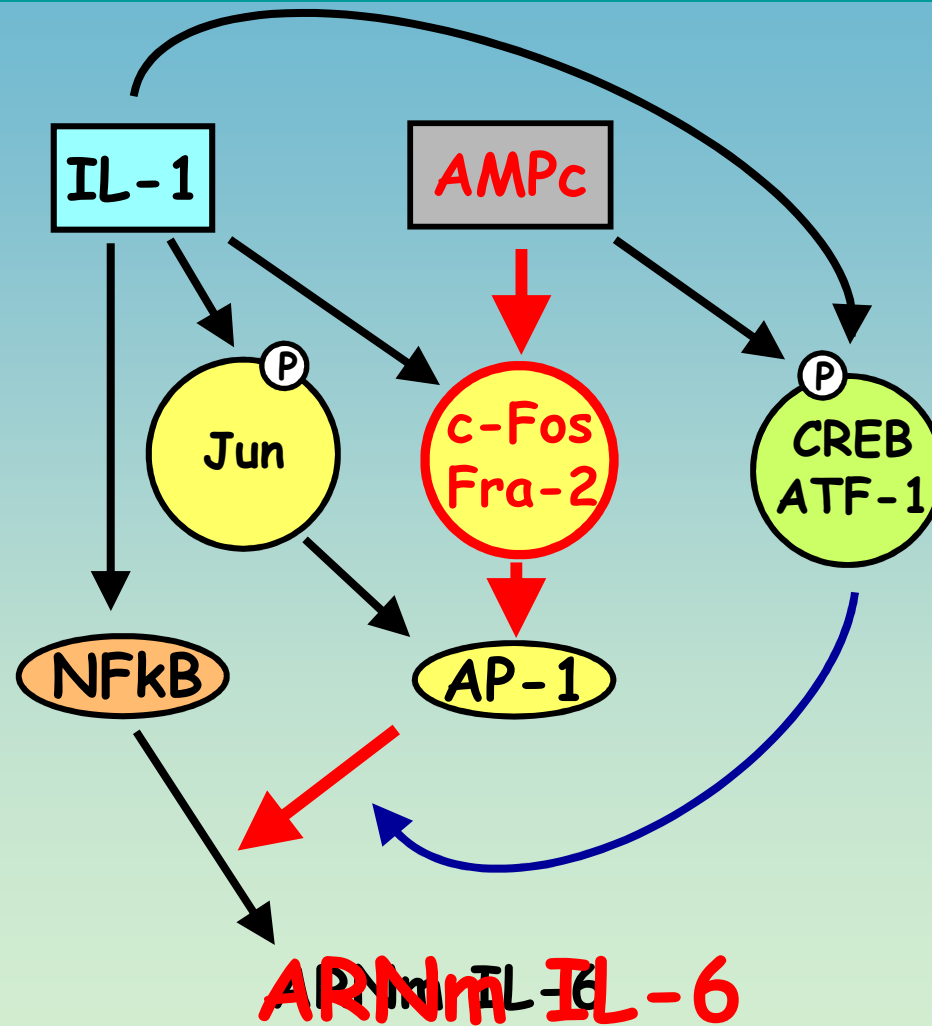
Stimulation 1h
Extraits nucléaires
Western-blot



Conclusion 2

- . L'AMPc augmente la stabilité de l'ARNm de l'IL-6
- . La TSH/ FSK stimule de manière synergique l'activité du promoteur de l'IL-6 induite par l'IL-1
- . Les sites AP-1 et CRE sont la cible de l'effet synergique
- . L'expression de c-Fos et Fra-2 est stimulée par l'IL-1/FSK de manière synergique

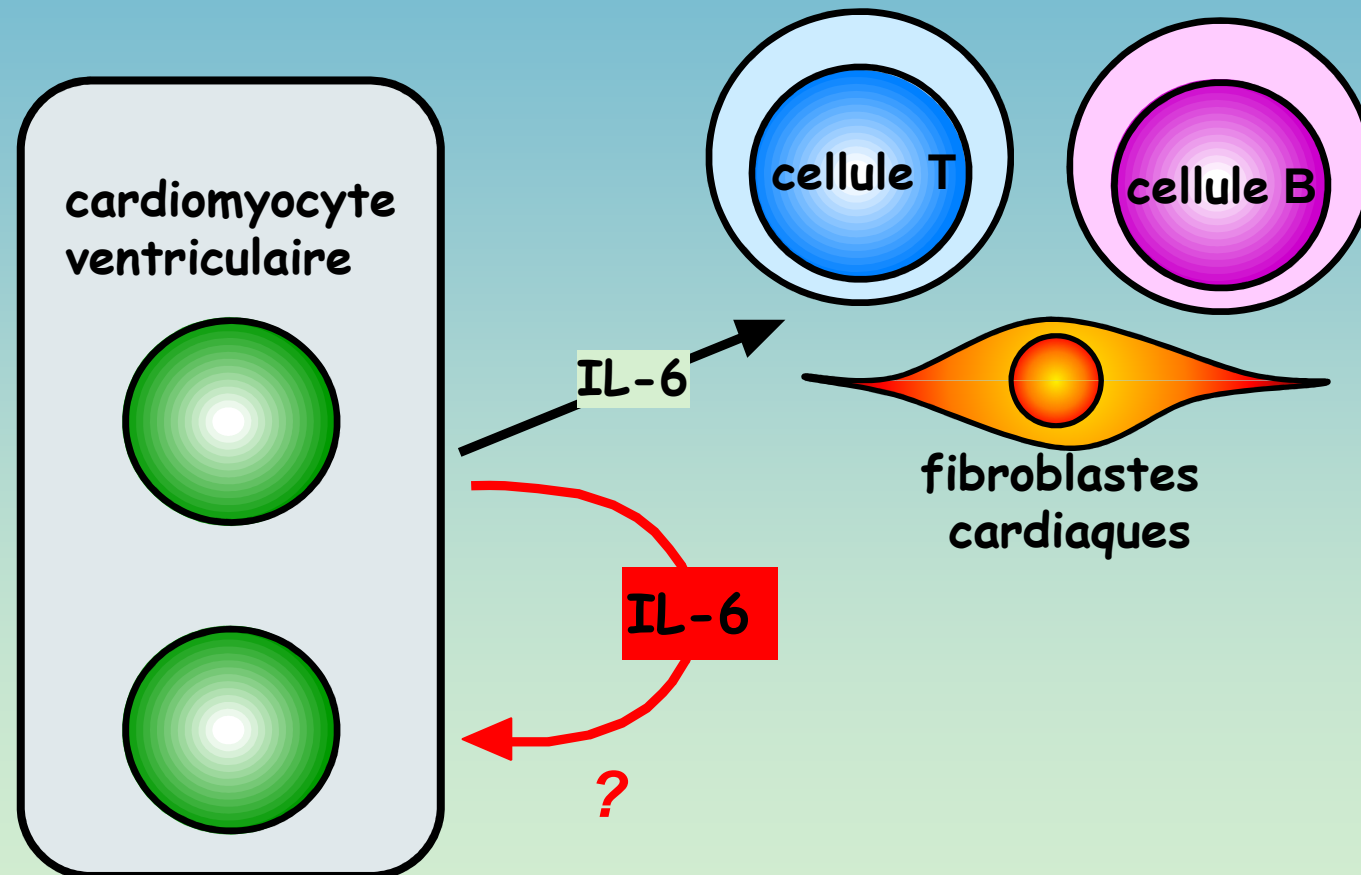
Dialogues entre l'IL-1 et l'AMPC dans l'expression synergique de l'IL-6



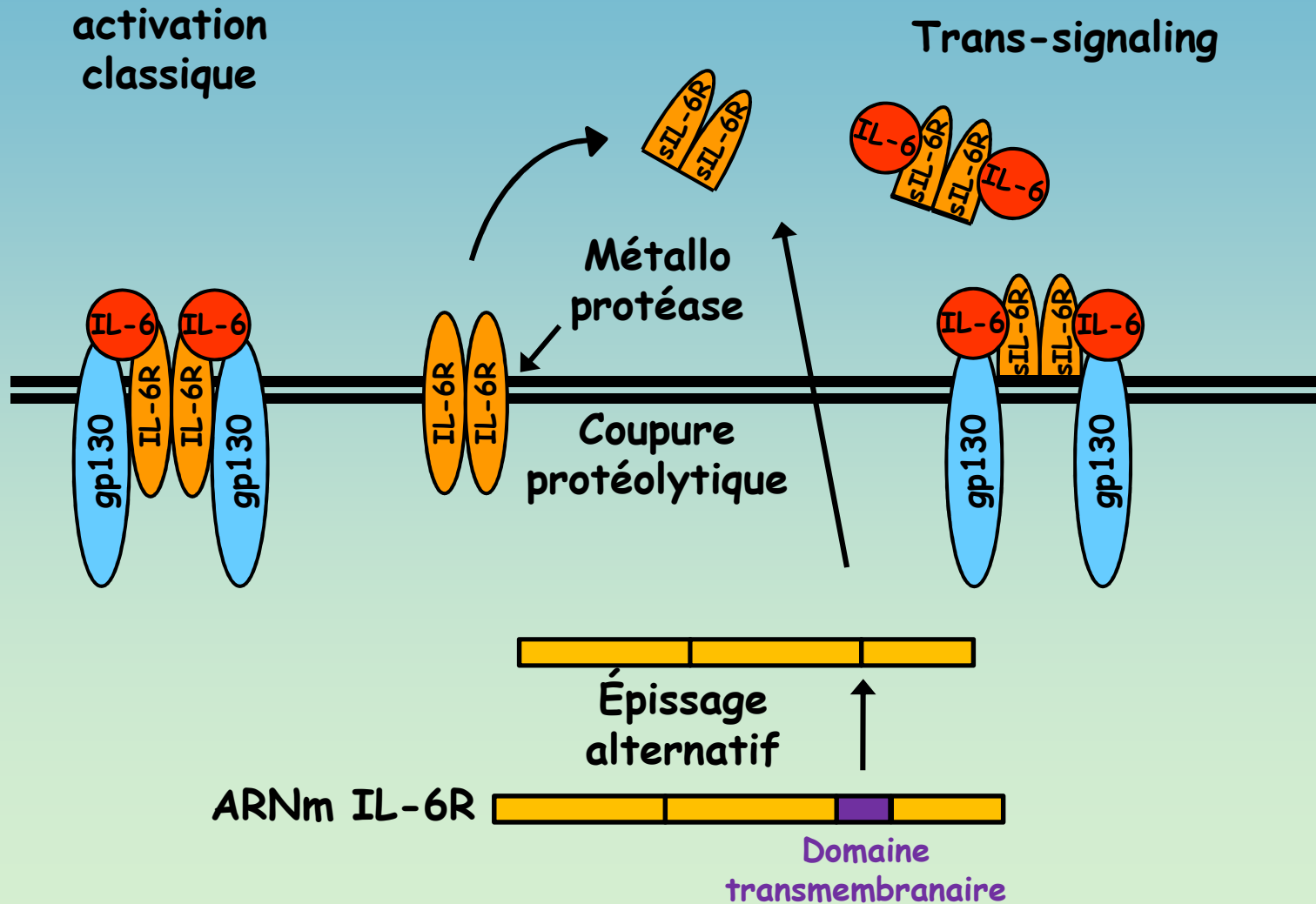
Plan de l'exposé

- 1) Dialogues entre les voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc dans la production de l'IL-6
- 2) Mécanismes de régulations de la synergie au niveau de la stabilité de l'ARNm et au niveau transcriptionnel
- 3) **Voies de signalisation activées par l'IL-6 et par le mécanisme de « trans-signaling » dans les cardiomyocytes**
- 4) « Trans-signaling » et induction de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque
- 5) Conclusions-Perspectives

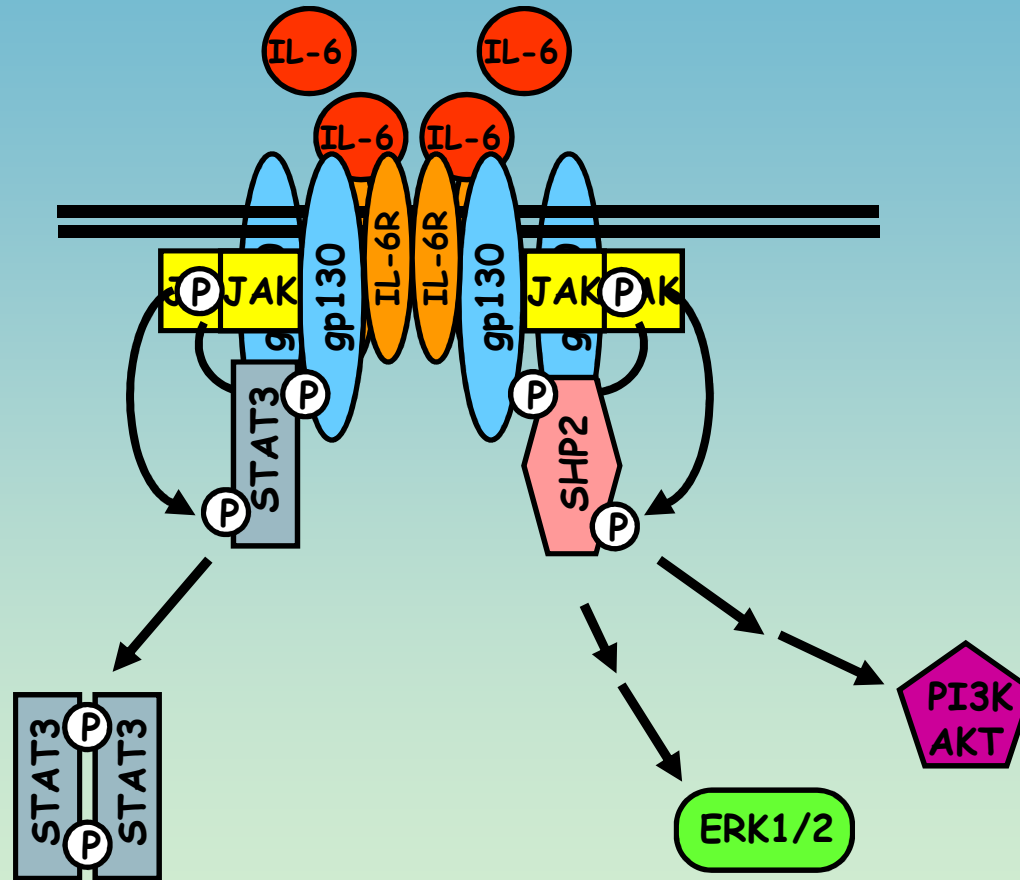
Action paracrine/autocrine de l'IL-6 dans le tissu cardiaque ventriculaire



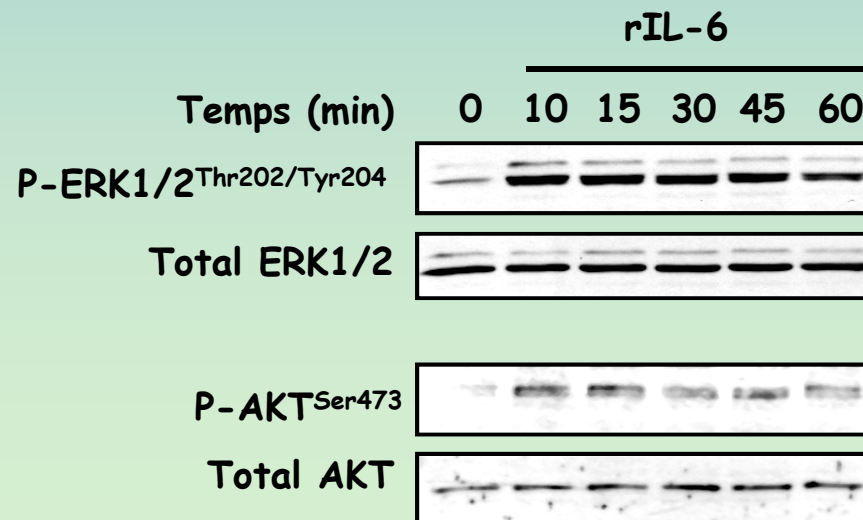
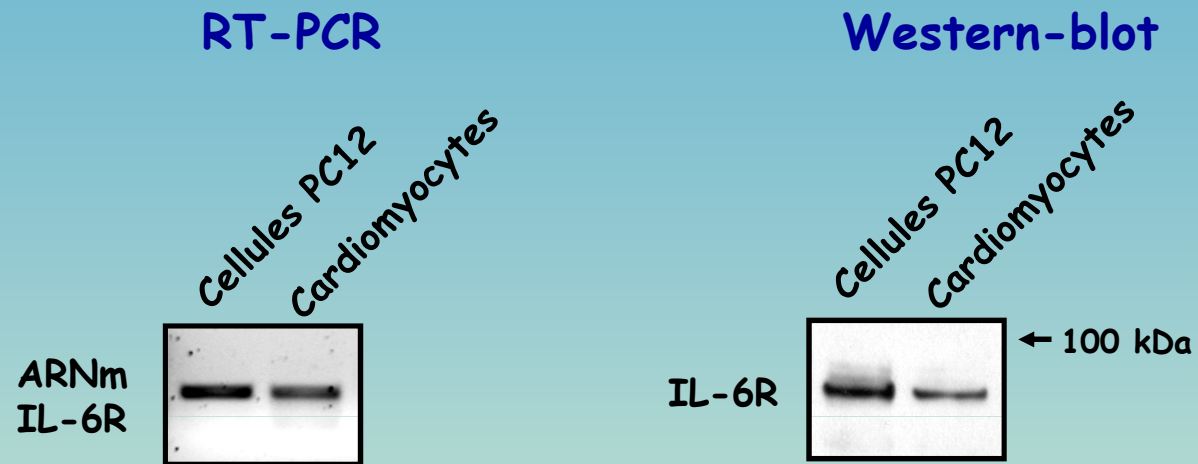
2 types de récepteurs pour l'IL-6



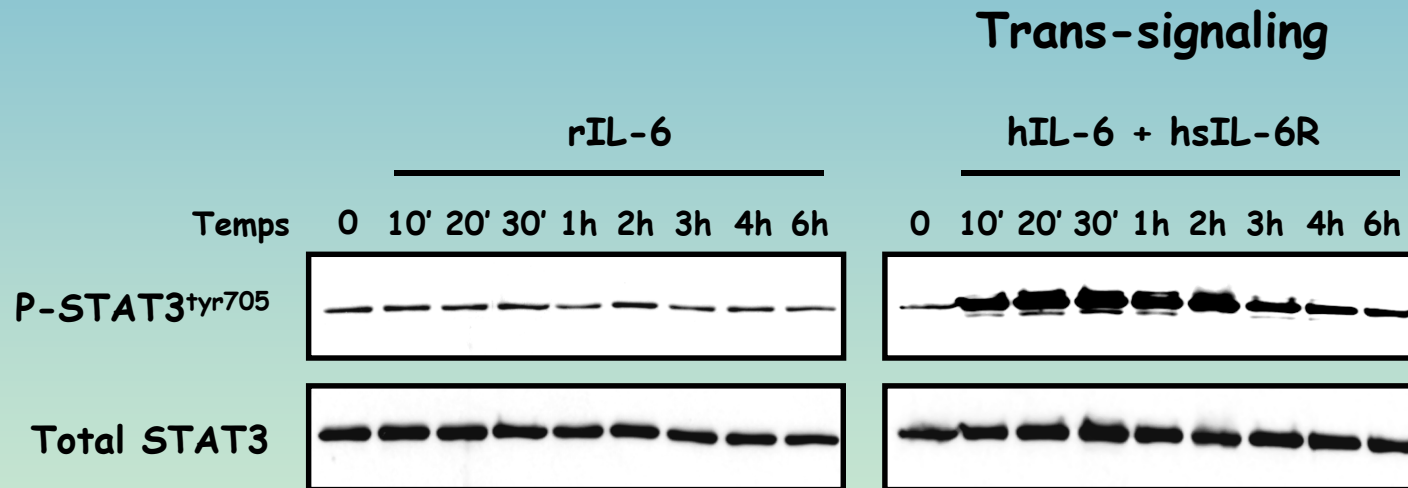
Voies de signalisation de l'IL-6



Etude de la phosphorylation des MAP kinases ERK1/2 et de AKT en réponse à l'IL-6



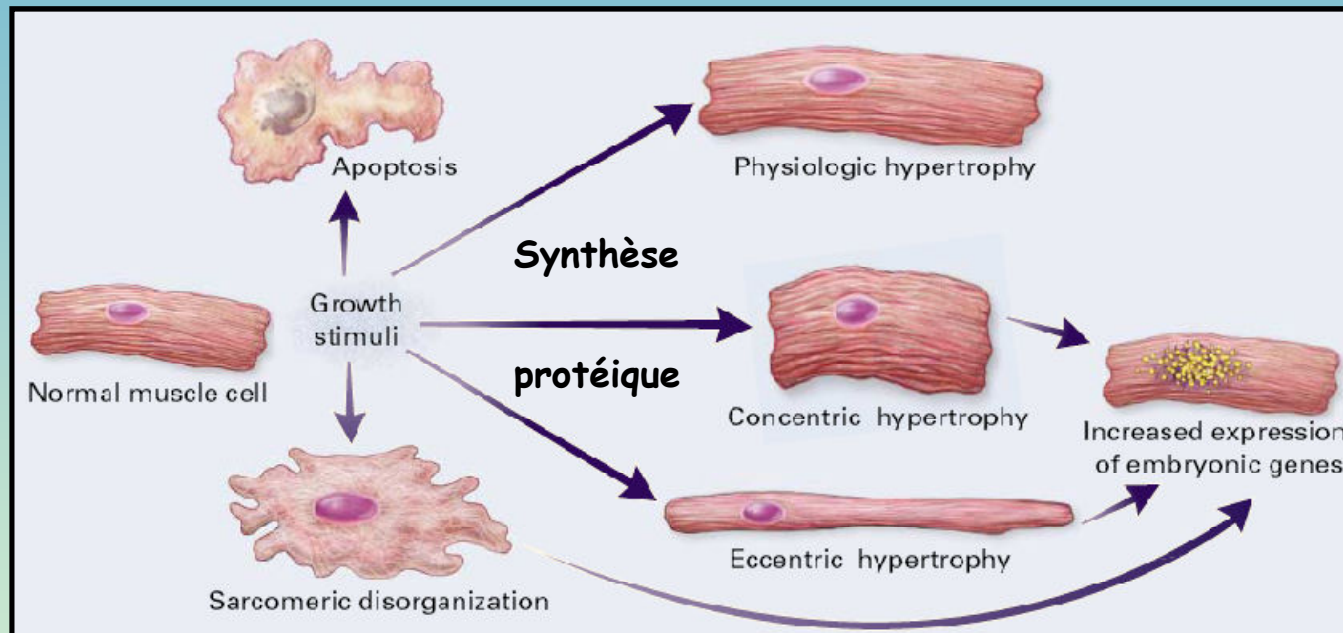
Etude de la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'IL-6 dans les cardiomyocytes de rats



Plan de l'exposé

- 1) Dialogues entre les voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc dans la production de l'IL-6
- 2) Mécanismes de régulations de la synergie au niveau de la stabilité de l'ARNm et au niveau transcriptionnel
- 3) Voies de signalisation activées par l'IL-6 et par le mécanisme de « trans-signaling » dans les cardiomyocytes
- 4) « Trans-signaling » et induction de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque
- 5) Conclusions-Perspectives

Morphologie des cardiomyocytes dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque



Peptides natriurétiques (BNP)
Gène précoce (c-Fos)

Hunter and Chien, 1999

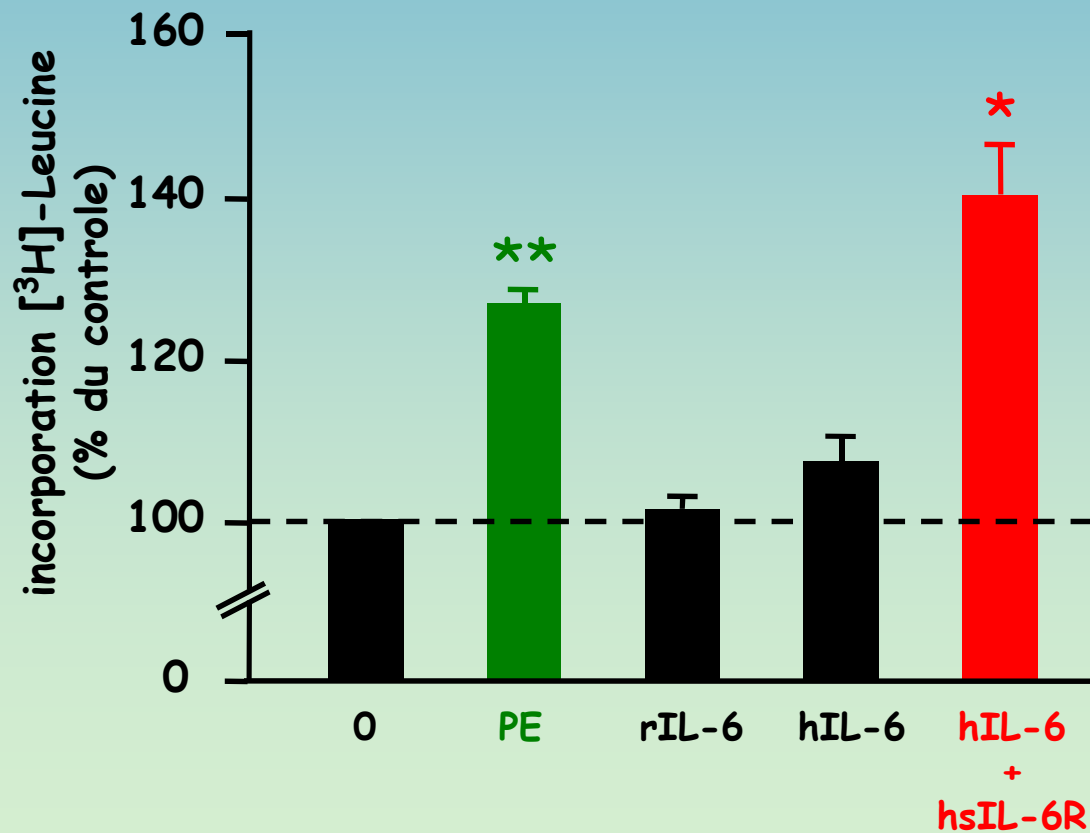
Effets cardiaques des cytokines de la famille IL-6

- **LIF, CT-1/cardiomyocytes, myocarde**
↑ survie, ↑ l'hypertrophie cardiaque, ↑ régénération myocarde
Negoro et coll (2001) Circulation
Kodoma et coll (1997) Circ Res
Zou et coll (2003) Circulation
- **Souris TG surexpression IL-6 + IL-6R :**
Hypertrophie ventriculaire chez l'adulte
Hirota et coll (1995) PNAS

Mesure de la synthèse protéique

Cardiomyocytes

stimulation 24h



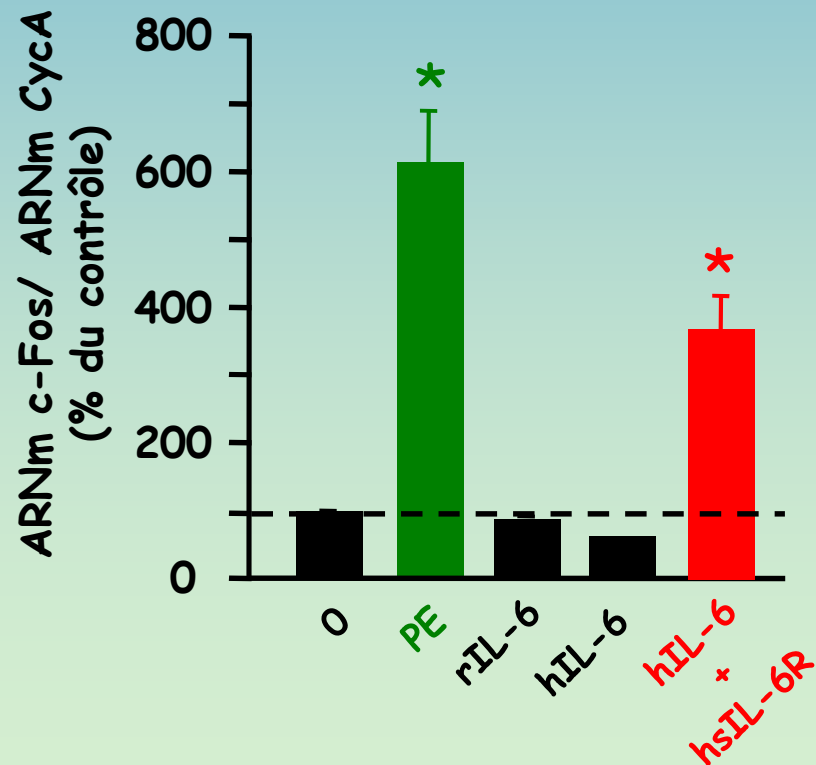
PE: phényléphrine (agoniste alpha-adrénergique)

Etude de l'induction de gènes associés au processus hypertrophique

Cardiomyocytes

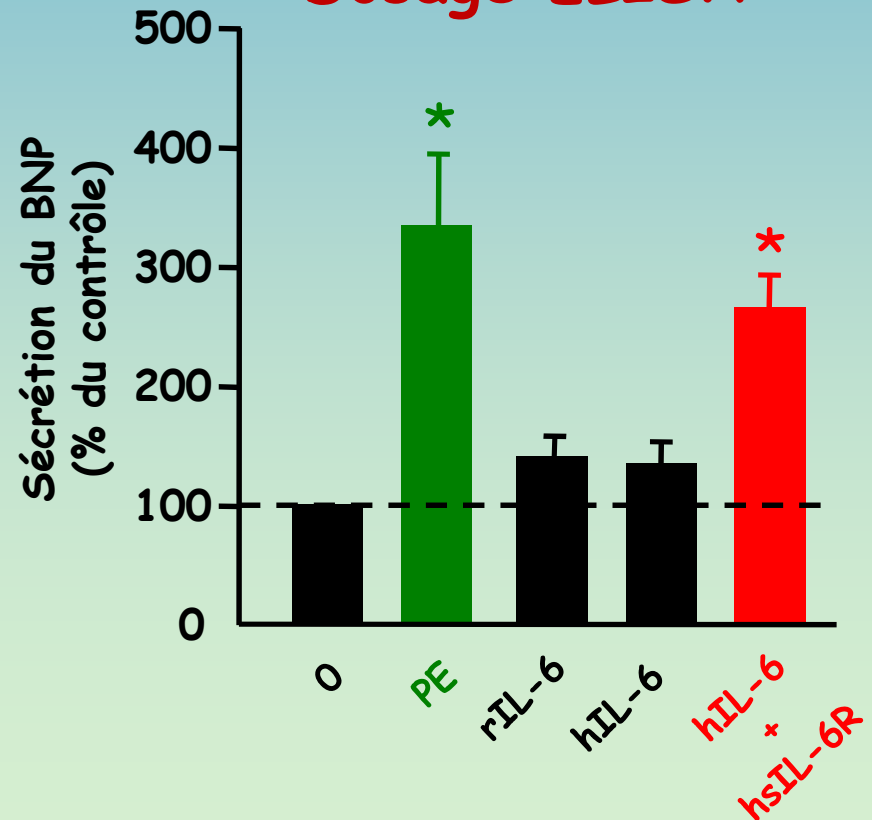
stimulation 1h30

RT-PCRq



stimulation 48h

Dosage ELISA



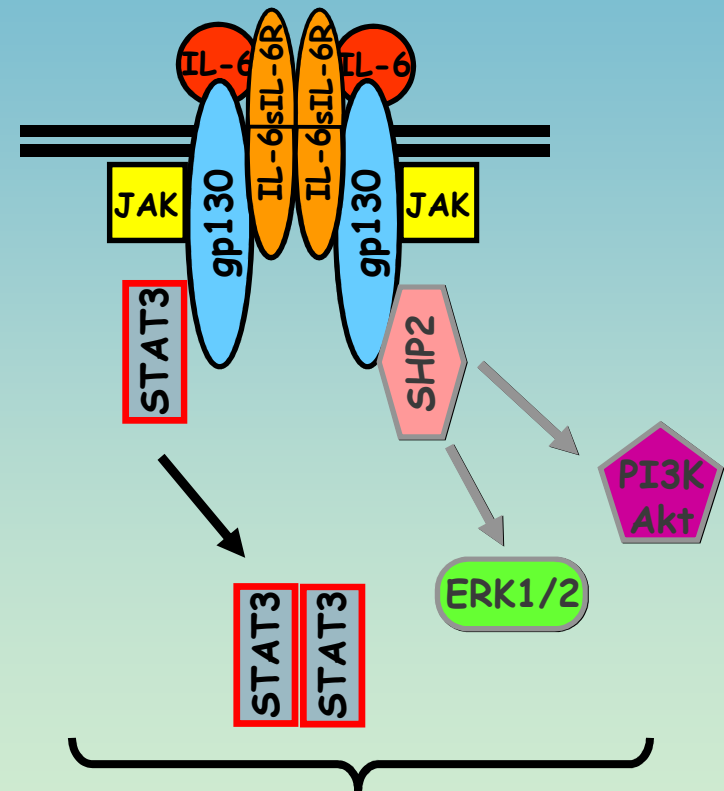
Conclusion 3

Cardiomyocytes

• Expression signaling par l'IL-6 est indispensable:

→ Dans l'activation de STAT3

→ Dans l'expression des marqueurs associés au processus hypertrophique

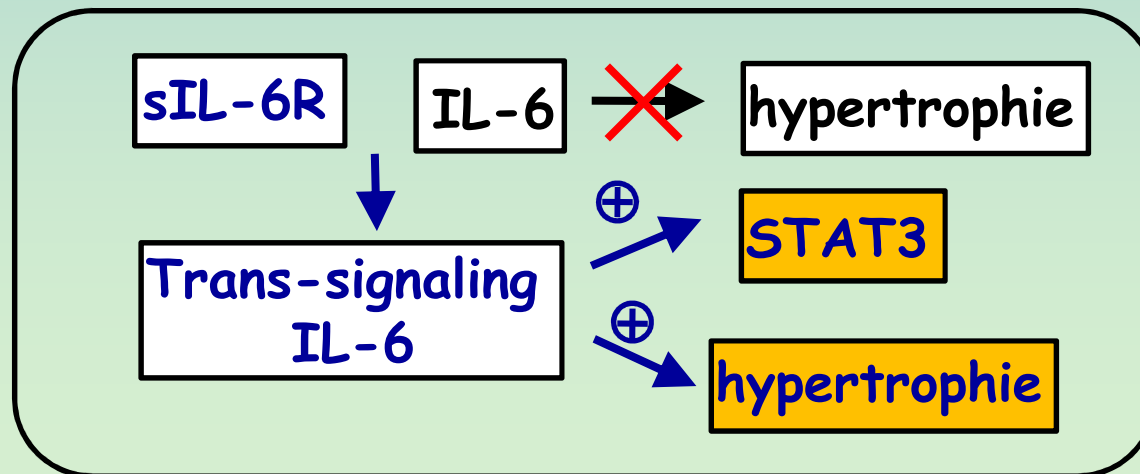
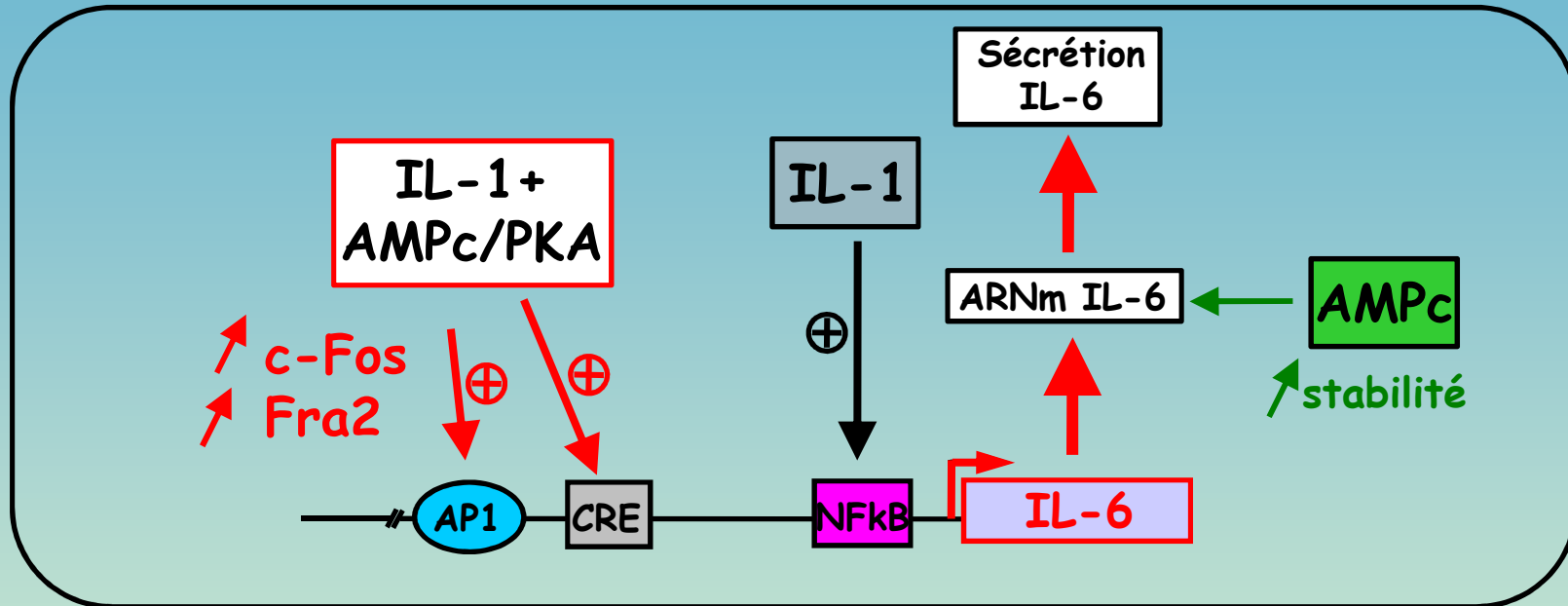


- ↑ Synthèse protéique
- ↑ Expression de c-Fos
- ↑ Sécrétion du BNP

Plan de l'exposé

- 1) Dialogues entre les voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc dans la production de l'IL-6
- 2) Mécanismes de régulations de la synergie au niveau de la stabilité de l'ARNm et au niveau transcriptionnel
- 3) Voies de signalisation activées par l'IL-6 et par le mécanisme de « trans-signaling » dans les cardiomyocytes
- 4) « Trans-signaling » et induction de marqueurs de l'hypertrophie cardiaque
- 5) **Conclusions-Perspectives**

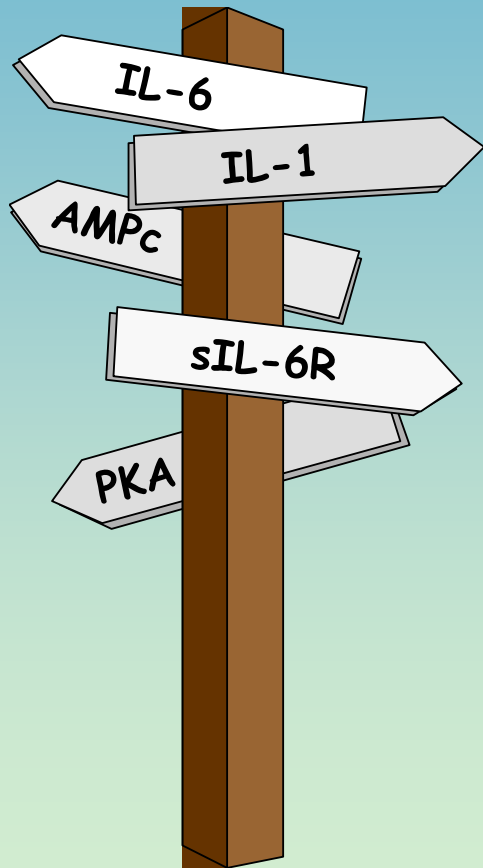
Conclusion générale



Perspectives

- Etudier le mécanismes du trans-signaling de l'IL-6 dans les cellules FRTL-5 puis dans thyrocytes humains.
- Etudier les mécanismes qui conduisent à l'activation spécifique de STAT3 par trans-signaling
 - **niveau critique d'activation de la gp130**
- Montrer l'implication de STAT3 dans la stimulation de l'hypertrophie cellulaire des cardiomyocytes par l'IL-6
- Mettre en évidence l'effet autocrine IL-1+ISO sur l'hypertrophie
 - **Production du récepteur soluble de rat**
 - **Étude sur cellules humaines**

Remerciements



Martine Pomérance

Jean-Paul Blondeau

Rodolphe Fischmeister

Françoise Chantoux

Florence Lefebvre

Aurore Germain