



HAL
open science

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.

Nicolas François Lajos Szabo-Fresnais

► To cite this version:

Nicolas François Lajos Szabo-Fresnais. 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.. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: . tel-00451370

HAL Id: tel-00451370

<https://theses.hal.science/tel-00451370>

Submitted on 28 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire

Ecole Doctorale de rattachement : Signalisations et réseaux intégratifs en biologie ED 419

présentée et soutenue publiquement

Par

Nicolas SZABO-FRESNAIS

le 14 octobre 2009

Titre :

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 rat

Directeur de thèse : Dr. **POMÉRANCE Martine**

JURY

Pr. MISRAHI-ABADOU	Micheline	(Président)
Dr. ROGER	Pierre	(Rapporteur)
Pr. BIGARD	Xavier	(Rapporteur)
Dr. GOUILLEUX	Fabrice	(Examinateur)
Pr. MARTINY	Laurent	(Examinateur)
Dr. POMERANCE	Martine	

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury, Mesdames Pomérance Martine et Misrahi-Abadou Micheline et Messieurs Roger Pierre, Bigard Xavier, Gouilleux Fabrice et Martiny Laurent pour avoir accepté d'analyser ce travail. Soyez assurés de ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Jean-Paul Blondeau pour son accueil au sein de son unité UMR 486 INSERM-Paris Sud « Transduction hormonale et régulation cellulaire ». Lors de mon entretien, il m'a dit une phrase que l'on ne peut oublier (parmi tant d'autres !) : « nous avons plusieurs candidatures mais votre profil nous intéresse vraiment »... j'avais mis mon T-shirt « Dream Theater », c'est peut-être une explication. JPB, en autres, je te remercie pour m'avoir transmis tout ce qui tient dans cette citation que tu m'as apprise « science sans conscience n'est que ruine de l'âme ».

Mes sincères remerciements à Rodolphe Fischmeister, directeur de l'UMR 769 INSERM-Paris Sud « Signalisation et physiopathologie cardiaque » pour m'avoir accueilli au sein de son unité et de son équipe (les PDE pour ceux qui ne savent pas mais cela m'étonnerait beaucoup) au cours de ma thèse et qui m'a permis de mener à terme le projet de ma thèse dans d'excellentes conditions de travail.

Martine, « les paroles s'envolent mais les écrits restent », alors accroche-toi bien. Depuis 6 ans nous travaillons ensemble sur l'IL-6 et notre recherche a permis d'aboutir à 2 jolies publications et à ce beau manuscrit. Ton encadrement est sans faille, c'est à dire une disponibilité à 100 %, (voir plus), une excellente maîtrise des techniques expérimentales et surtout une grande qualité pédagogique dans la transmission de ton savoir que j'ai pu transmettre, en partie, par la suite aux divers étudiants de passage. Spécialement, je te remercie pour ta patience et pour ton soutien moral quand j'ai eu des coups de mou. Enfin, je te remercie pour les bonnes spécialités vendéennes que tu me ramènes lors de tes vacances. Merci aussi pour la belle excursion sur l'île d'Egine que tu nous avais préparée.

Encore beaucoup de remerciements pour leurs aides : Claude Corrèze, Françoise Chantoux, Anne-Marie de Sousa de l'U486 ; Maya Bimbot, Yves Lévi du labo de santé publique ; Sophie Lebezot, Aurore Germain, Florence Lefebvre de l'U769.

Merci aux étudiants de passage qui ont apporté leurs contributions à ce travail : Nacira, Gaëlle, Dorothée, Alexandra, Flavie, Lorna, Emmanuelle et Mourad.

Merci à l'ensemble du personnel de l'Unité 769 pour leur soutien.

ABBREVIATIONS

A : adénine
aa : acide aminé
ADAM : a disintegrin and metalloproteinase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AKAP : A kinase anchor proteins
Akt : AKR thymic antigène
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ANF: atrial natriuretic factor
AP-1 : activator protein 1
ARE: AU-rich elements
ATF: activating transcription factor
ATP: adénosine triphosphate
Bcl: B-cell lymphoma
BNP: brain natriuretic factor
C: cytosine
C/EBP : CAAT Enhancer Binding Protein
Ca²⁺ : calcium
CaMKII : calmoduline kinase II
CBM: Cytokine Binding Module
CBP: CREB binding protein
CDK: cyclin-dependant kinase
CHO: chinese hamster ovary cells
CNTF: ciliary neurotrophic factor
COX-2: cyclo-oxygénase 2
CRE: cAMP response element
CREB: CRE binding protein
CRP: C-reactive protein
CT-1 : cardiotrophin 1
Da: Dalton
DAG: diacylglycerol
DD: death domain
DUOX : Dual Oxydase
EC50 : concentration effective prise à 50 % d'un effet
EGF: epidermal growth factor
Elk: ets-like gene
Epac: exchange protein directly activated by cAMP
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FGF: fibroblast growth factor
FRTL-5 : Fisher rat thyroid cell line
FSK: forskoline
G: guanine
GDP: guanosine diphosphate
GRK: G protein-coupled receptor kinases
GTP : guanosine triphosphate

HeLa : lignée cellulaire immortalisée dérivée d'un cancer cervical d'une patiente Henrietta Lacks
 HRP: peroxydase du raifort
 HTori3: human differentiated thyroid epithelial cells
 ICAM: intercellular adhesive molecule
 ICE: interleukin 1 converting enzyme
 ICER: inducible cAMP early repressor
 IFN: Interferon
 IGF-1 : Insulin-like growth factor 1
 IgG: Immunoglobuline G
 IKK: IκB kinase
 IL-: interleukine
 IL-1R : IL-1 receptor
 IL-1Ra : IL-1 receptor antagonist
 IL-1R-AcP : IL-1 Receptor Accessory Protein
 IL-6R : IL-6 receptor
 iNOS: monoxyde d'azote (NO) synthase inductible
 IP3: inositol triphosphate
 IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
 IRF: interferon regulatory factor 1
 ISO : isopoprénaline
 JAK : Janus kinase
 JNK : c-Jun N-terminal Kinase
 KDa : kiloDa
 KO : knockout
 LIF: leukemia inhibitory factor
 MAPK: mitogen-activated protein kinase
 MEF-2 : myocyte-specific enhancer factor 2
 MK2: Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
 MKK: MAPK kinase
 mTOR: mammalian target of rapamycin
 MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88
 NFAT: nuclear factor of activated T cell
 NF-κB: nuclear factor-κB
 NIS: symporteur Na⁺/I⁻
 NOS : NO synthase
 NUE: NIS upstream enhancer
 OSM: oncostatine M
 p70S6K : p70 ribosomal protein S6 kinase
 PCCL3: cellules épithéliales thyroïdiennes dérivée de rats Fisher adultes
 PDE: phosphodiesterase
 PE: phényléphrine
 PI3K: phosphoinositide 3-kinase
 PIP2: phosphatidylinositol (4,5) biphosphate
 PKA: protéine kinase dépendante de l'AMPc
 PKC: protéine kinase c
 PL: phospho-lipase
 RS : réticulum sarcoplasmique
 RyR: récepteur à la ryanodine
 SH2: Src homology domain 2

SHP2: SH2-containing protein tyrosine phosphatase
sil-6R : IL-6R soluble
SOCS: suppressor of cytokine signalling
SP-1 : specificity protein 1
STAT: Signal Transducers and Activator of Transcription
T : thymidine
T3 : tri-iodothyronine
T4 : thyroxine
TAB : TAK-1 binding protein 1
TAK : TGF- β -activated kinase 1
TBAb: auto-anticorps bloquant le TSHR
TBP: TATA binding protein
Tg: thyroglobuline
TIR: Toll-like receptor and IL-1 related
TNF: tumor necrosis factor
TnI: troponine I
TPO: thyropéroxydase
TRAF-6 : TNF receptor-associated factor 6
Trp: transient receptor potential
TSAb : auto-anticorps stimulants de la thyroïde
TSH : hormone stimulant la thyroïde
TSHR : récepteur de la TSH
TTF-1 : thyroid transcription factor-1
UTR: untranslated region
V-CAM: vascular-cell adhesion molecule
WRT: Wistar rat thyroid cell line

TABLE DES MATIERES

.....	11
INTRODUCTION	11
I. L'AMP CYCLIQUE : UNE MOLÉCULE CLEF DANS LA THYROÏDE ET DANS LE CŒUR.....	14
A. Généralités.....	14
B. La glande thyroïde et le thyrocyte.....	19
C. Régulation du thyrocyte par la TSH.....	22
1. Structure et production de la TSH.....	22
2. Le récepteur de la TSH.....	22
3. La voie de signalisation de l'AMPc.....	26
a. Activation du signal AMPc.....	26
b. Inhibition du signal AMPc.....	32
4. Régulation de la fonction.....	32
5. Régulation de la différenciation.....	32
6. Régulation de la prolifération.....	33
D. Les autres facteurs de régulation du thyrocyte.....	34
E. Maladies auto-immunes thyroïdiennes : anticorps stimulants et bloquants.....	37
.....	39
F. Le cœur et le cardiomyocyte.....	39
G. Le couplage excitation-contraction.....	42
H. Les catécholamines et sélectivité des récepteurs adrénergiques.....	43
1. Production des catécholamines.....	44
2. Les récepteurs adrénergiques et leurs mutations	44
b. Les récepteurs beta-adrénergiques.....	47
3. Les voies de signalisation β -adrénergiques dépendantes de l'AMPc.....	48
4. Les voies de signalisation β -adrénergiques non-dépendantes de l'AMPc.....	49
5. Régulation β -adrénergique de la transcription.....	50
I. L'AMPc dans la pathologie cardiaque.....	51
A. Structure et maturation.....	54
1. Maturation de l'IL-1 β	54
2. Maturation de l'IL-1 α	54
3. Maturation de l'IL-1Ra.....	55
B. Production.....	55
C. Le complexe récepteur de l'IL-1.....	56
1. Le récepteur de type I.....	56
2. La protéine accessoire : IL-1R-AcP.....	57
3. Le récepteur de type II.....	57
4. Activation du complexe-récepteur de l'IL-1.....	60
5. Les voies de signalisation induites par l'IL-1.....	61
a. la voie NF-kB.....	62
b. La voie des JNK	62

c. La voie des p38-MAPK.....	62
d. La voie des céramides.....	63
<i>D. Facteurs de transcription et régulation de l'expression génique.....</i>	<i>63</i>
<i>E. Effets biologiques.....</i>	<i>64</i>
a. Dans la thyroïde.....	64
b. Dans le cœur.....	65
III. L'INTERLEUKINE 6.....	66
<i>A. Les cytokines de la famille IL-6.....</i>	<i>66</i>
<i>B. Structure et régulation du gène codant pour l'IL-6.....</i>	<i>66</i>
1. Description du promoteur.....	66
2. Activation du promoteur	69
3. Répression du promoteur :.....	69
<i>C. Structure de l'ARNm et stabilité.....</i>	<i>71</i>
1. Structure de l'ARNm	71
2. Stabilité.....	71
<i>D. Structure de la protéine et production.....</i>	<i>72</i>
1. Régulation de la production de l'IL-6 dans la thyroïde.....	74
2. Régulation de la production de l'IL-6 dans le cœur.....	76
<i>E. Le complexe récepteur de l'IL-6.....</i>	<i>77</i>
1. Le récepteur membranaire de l'IL-6.....	79
2. Le récepteur soluble de l'IL-6.....	81
3. La glycoprotéine 130.....	82
4. Formation du complexe récepteur.....	82
6. Les voies de signalisation induites par l'IL-6.....	85
a. La voie de signalisation JAK-STAT.....	85
b. la voie de signalisation SHP2-MAPK :	88
<i>F. Effets biologiques.....</i>	<i>90</i>
1. Effets dans la thyroïde.....	91
2. Effets dans le cœur.....	91
OBJECTIF DU TRAVAIL :.....	93
.....	96
MATERIELS ET METHODES.....	96
I. PRODUITS.....	97
<i>A. Stimuli.....</i>	<i>97</i>
<i>B. Culture cellulaire.....</i>	<i>97</i>
<i>C. Oligonucléotides</i>	<i>97</i>
<i>D. Anticorps</i>	<i>97</i>
II. CULTURE CELLULAIRE.....	98
<i>A. La lignée cellulaire FRTL-5.....</i>	<i>98</i>
1. Passages.....	99
2. Congélation des cellules	99

3. Décongélation des cellule.....	99
<i>B. Les cardiomyocytes de rats adultes.....</i>	<i>100</i>
1. Protocole de dissociation	100
III. PRÉPARATION DES EXTRAITS PROTÉIQUES.....	102
<i>A. Extraits totaux.....</i>	<i>103</i>
<i>B. Extraits solubles cytoplasmiques.....</i>	<i>103</i>
<i>C. Extraits nucléaires.....</i>	<i>103</i>
IV. QUANTIFICATION DES ARN.....	106
<i>A. Extraction.....</i>	<i>106</i>
<i>B. Quantification de la concentration et évaluation de la qualité.....</i>	<i>106</i>
<i>C. Synthèse, purification et marquage de la sonde IL-6.....</i>	<i>108</i>
<i>D. Analyse par Northern-blot.....</i>	<i>108</i>
<i>E. Analyse par Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....</i>	<i>109</i>
1. Reverse transcription	109
2. Polymerase Chain Reaction.....	110
V. PLASMIDES ET AMPLIFICATION PAR TRANSFORMATION BACTÉRIENNE.....	111
VI. DOSAGE DES CONCENTRATIONS PROTÉIQUES.....	113
<i>A. Dosage Bradford.....</i>	<i>113</i>
<i>B. Dosage BCA.....</i>	<i>113</i>
VII. MESURE DE L'INCORPORATION DE 3H-THYMIDINE.....	114
VIII. MESURE DE L'INCORPORATION DE 3H-LEUCINE.....	114
IX. DOSAGE ELISA.....	115
<i>A. Dosage de l'IL-6 sécrétée.....</i>	<i>115</i>
<i>B. Dosage du BNP sécrété.....</i>	<i>116</i>
X. ANALYSE PAR WESTERN-BLOT.....	117
XI. TRANSFECTION TRANSITOIRE ET DOSAGES DES ACTIVITÉS LUCIFÉrase ET BÉTA-GALACTOSIDASE.....	117
XII. EMSA.....	118
RÉSULTATS.....	120
I. RÔLE DE L'AMPC DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE L'IL-6 PAR L'IL-1 ET EFFET DE IL-6 DANS LES CELLULES THYROÏDIENNE FRTL-5	121
<i>A. Introduction.....</i>	<i>121</i>
<i>B. Résumé des résultats publiés.....</i>	<i>121</i>
<i>C. Résultats non-publiés.....</i>	<i>123</i>
1. Activation des voies de signalisation par l'IL-6.....	123
2. Effet de l'IL-6 sur l'expression de l'ARNm du NIS stimulée par FSK.....	126
3. Effet de l'IL-6 sur la prolifération stimulée par l'INS en association avec la FSK.....	128
<i>D. Conclusion-discussion.....</i>	<i>130</i>
ARTICLE 1.....	131
II. PRODUCTION SYNERGIQUE DE L'IL-6 EN REPOSE A L'ISO ET L'IL-1 ET EFFET AUTOCHRINE DE L'IL-6 DANS LES CARDIOMYOCYTES DE RATS ADULTES.....	132

<i>A. Introduction</i>	132
<i>B. Résumé des résultats soumis pour publication</i>	133
1. Effet synergique de l'ISO sur la sécrétion de l'IL-6 induite par l'IL-1	133
2. Activation des voies de signalisation et effets de l'IL-6	134
<i>C. Résultats non-publiés</i>	135
1. Etude du rôle des sous-types des récepteurs β -adrénergiques sur l'effet synergique de l'IL-1/ISO dans la sécrétion de l'IL-6.....	135
2. Etude du rôle des sous-types des PDE sur l'effet synergique de l'IL-1/ISO dans la sécrétion de l'IL-6. .	135
ARTICLE 2	142
DISCUSSION-PERSPECTIVES	143
I. PRODUCTION DE L'IL-6 ET MÉCANISMES IMPLIQUÉS.....	145
<i>A. Production sous l'effet de l'IL-1</i>	145
1. Régulation de la sécrétion de l'IL-6.....	145
2. Régulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6.....	146
<i>B. Production sous l'effet d'autres cytokines</i>	146
<i>C. Production sous l'effet de l'AMPc</i>	146
1. Régulation de la sécrétion de l'IL-6.....	147
2. Régulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6.....	147
<i>D. Production sous l'effet de l'IL-1 en combinaison avec l'AMPc</i>	148
1. Régulation de la sécrétion de l'IL-6.....	148
2. Régulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6.....	149
<i>E. Mécanismes impliqués</i>	150
1. Le complexe MyD88.....	150
2. Les voies des p38-MAPK et des JNK.....	150
4. La stabilité de l'ARNm de l'IL-6.....	151
5. Régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6.....	152
III. SIGNALISATION ET EFFET DE L'IL-6.....	154
<i>A. Régulation de l'expression du récepteur de l'IL-6</i>	154
<i>B. Signalisation de l'IL-6</i>	155
<i>C. Rôle de l'IL-6</i>	159
CONCLUSION	162
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164

INTRODUCTION

Le fonctionnement de tout organisme pluricellulaire nécessite une coordination entre les différents tissus et organes. Cette coordination se fait principalement par deux voies complémentaires : la voie nerveuse assurée par le système nerveux végétatif et la voie hormonale. L'hormone est une molécule informative extracellulaire qui agit sur des tissus cibles en y provoquant des modifications fonctionnelles.

Au niveau cellulaire, la régulation hormonale nécessite l'activation de voies de signalisation intracellulaires qui permettent de conduire le signal de la membrane vers le cytoplasme et le noyau. Parmi les nombreux signaux activés, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), un second messager intracellulaire, peut être synthétisé et alors il conduit à l'activation de voies de signalisations spécifiques. L'AMPc est largement décrit pour ses effets inhibiteurs, au niveau de la prolifération par exemple. Cependant, certains organes comme la glande thyroïde et le cœur sont régulés positivement par l'AMPc. En effet, leurs fonctions respectives sont sous la dépendance de régulations hormonales, l'hormone stimulant la thyroïde (TSH) pour la glande thyroïde et les catécholamines pour le cœur. Au niveau cellulaire, l'AMPc va réguler la prolifération, la différenciation et la fonction du thyrocyte. Et dans le cardiomyocyte, l'AMPc est impliqué principalement dans le mécanisme du couplage excitation-contraction. Ainsi, dans ces deux types cellulaires, l'AMPc active des voies de signalisation qui ont une action positive.

Classiquement, au cours des pathologies, il y a un stress entraînant la mise en place d'un foyer inflammatoire qui est une source majeure de cytokines pro-inflammatoires. L'une d'entre-elles, l'interleukine 1 beta (IL-1) est connue pour être sécrétée dans les phases précoces de l'inflammation. Par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, présents à la surface de cellules cibles, l'IL-1 active des voies de signalisation qui vont permettre une adaptation cellulaire rapide en réponse aux changements environnementaux induits par le stress. Ainsi, l'IL-1 est connue pour induire, dans de nombreux types cellulaires, l'interleukine 6 (IL-6), une autre cytokine pro-inflammatoire. Dans un contexte physiopathologique, l'IL-6 est une cytokine ayant de multiples fonctions qui est impliquée dans les maladies auto-immunes de la thyroïde telles que la thyroïdite d'Hashimoto et la maladie de Basedow et récemment, il a été montré que l'IL-6 est associée aux processus qui conduisent à l'insuffisance cardiaque.

Dans un tel contexte, l'expression de l'IL-6 induite par l'IL-1 est à mettre en relation avec la régulation hormonale de la cellule cible. Ainsi, dans le thyrocyte et le myocyte cardiaque, l'AMPc active des voies de signalisation qui peuvent interagir avec celles qui sont

activées par l'IL-1. Ces dialogues entre les voies de signalisation (« cross-talk », en anglais) pourraient avoir une incidence sur la régulation de l'expression de l'IL-6.

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'interaction entre les voies de signalisation de l'AMPC et celles induites par l'IL-1 dans la production de l'IL-6 et sur les effets de l'IL-6 dans les thyrocytes et dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat.

A. Généralités

Les hormones agissent sur des tissus cibles en y provoquant des modifications fonctionnelles. En effet, les cellules cibles possèdent les récepteurs spécifiques aux hormones qui permettent la transduction du signal au niveau intracellulaire. Parmi ces récepteurs spécifiques aux hormones, il existe une grande famille de récepteurs : les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques. Nous nous intéresserons ici à la sous-famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques stimulatrices de l'adénylate cyclase (AC), dont l'activation catalyse la production intracellulaire d'un second messenger : l'AMPc.

L'AMPc est le premier second messenger intracellulaire qui a été mis en évidence (Sutherland et Rall, 1958). Ce nucléotide cyclique est produit à partir d'adénosine triphosphate (ATP) dont la réaction est catalysée par la famille des AC tandis que la dégradation de l'AMPc est catalysée par une classe d'enzyme : les phosphodiesterases (PDE) (figure 1).

Lors de l'activation par un ligand (hormone, neurotransmetteur) d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G, les AC sont activées ou réprimées. Les protéines G sont des commutateurs moléculaires du signal et elles sont activées en réponse à de nombreux stimuli. Elles sont ancrées à la membrane cellulaire et elles connectent les récepteurs transmembranaires aux effecteurs des voies de signalisation intracellulaires. Les protéines G se composent de trois sous-unités : alpha, beta et gamma. Sur la base de similarités de séquences, les sous-unités α ont été divisées en quatre familles : α_s , α_i/o , $\alpha_q/11$, $\alpha_{12/13}$. Cette distinction est la base du classement des protéines G (table 1) (Milligan et Kostenis, 2006). Si la protéine G possède une sous-unité α_s , l'AC est activée, si la protéine G possède une sous-unité α_i , l'AC est inhibée (Neves et coll., 2002) (table 1).

La voie de signalisation impliquant les AC, dont la caractérisation remonte à plus de 40 ans (Sutherland et coll., 1962), a permis l'émergence de concepts clefs tels que les seconds messagers, la phosphorylation de protéines et de manière plus globale, la transduction du signal (Rodbell, 1995).

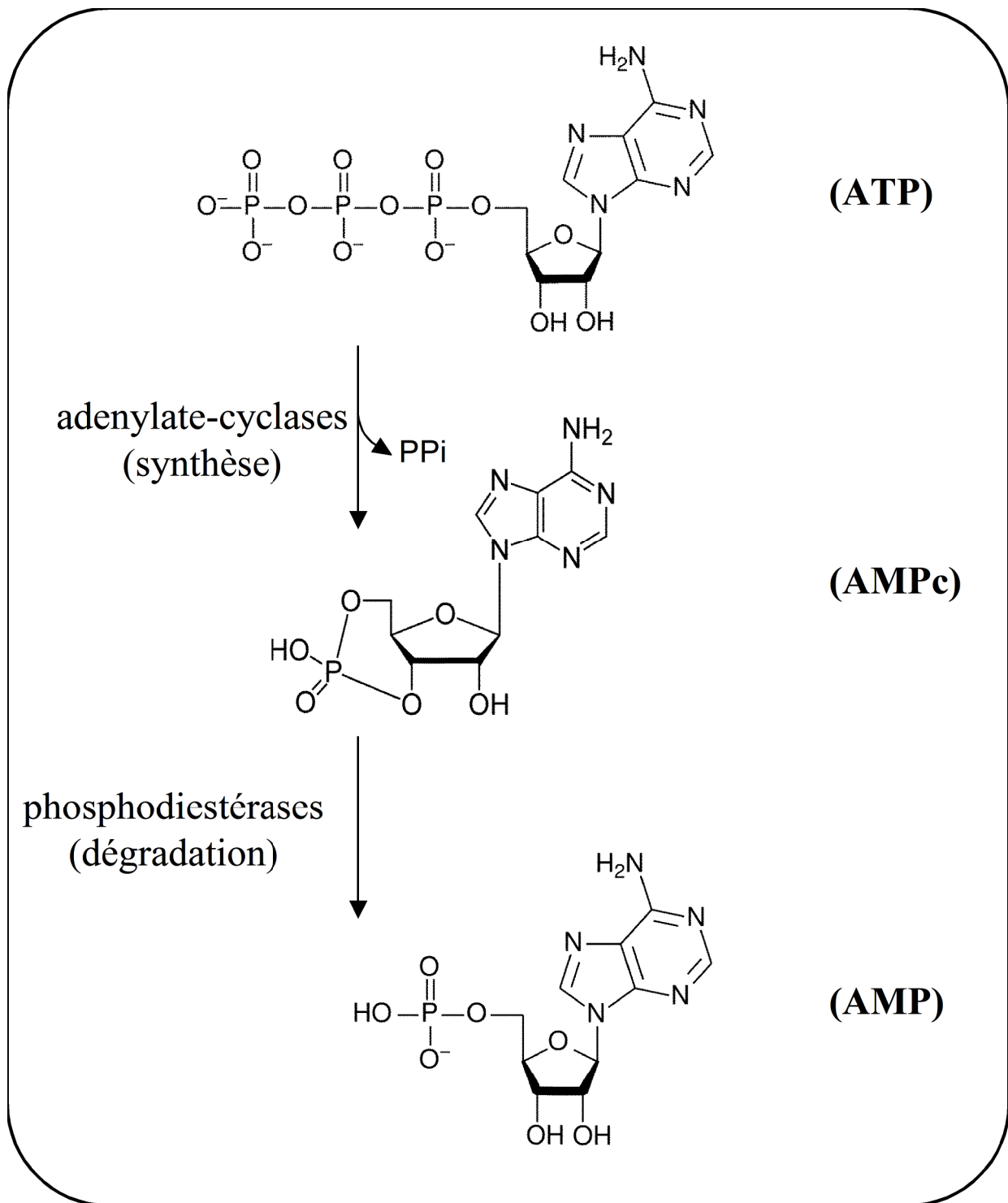


Figure 1: Métabolisme de l'AMPc.

Famille	sous-type	Effecteurs
G_s	G $\alpha_{s(S)}$	(+) AC
	G $\alpha_{s(L)}$	GTPase de la tubuline; src tyrosine kinases
	G α_{olf}	(+) AC
G_{i/o}	G α_i	(-) AC; Rap 1 GAP
	G α_o	GTPase de la tubuline; src tyrosine kinases
G_{q/11}	G α_q	Phospholipase C β
	G α_{11}	Tyrosine kinase de Bruton
G_{12/13}	G α_{12}	Phospholipase D
	G α_{13}	Phospholipase C ϵ

Table 1: Classification des sous-unités G α et de leurs effecteurs.

(+): stimule; (-) : inhibe. (Adapté de Milligan et Kostenis, 2006)

Les hormones, dont le récepteur est à sept domaines transmembranaires et qui est couplé aux protéines Gs, régulent de nombreuses fonctions cellulaires en activant le système ubiquiste de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Walsh et coll., 1968). L'AMPc se lie sur les sous-unités régulatrices de la PKA, ce qui entraîne la libération des sous-unités catalytiques (figure 2). Ces sous-unités catalytiques ainsi libérées induisent la phosphorylation de protéines jusqu'à ce que les taux d'AMPc deviennent limitant pour que les sous-unités régulatrices regagnent leurs affinités pour les sous-unités catalytiques (Scott, 1991). Une autre cible activée directement par l'AMPc a été mise en évidence : un facteur d'échange du GDP (guanosine diphosphate) en GTP (guanosine triphosphate) pour la protéine G monomérique Rap1, dénommé Epac (pour facteur d'échange activé directement par l'AMPc) (Bos, 2003) (figure 2).

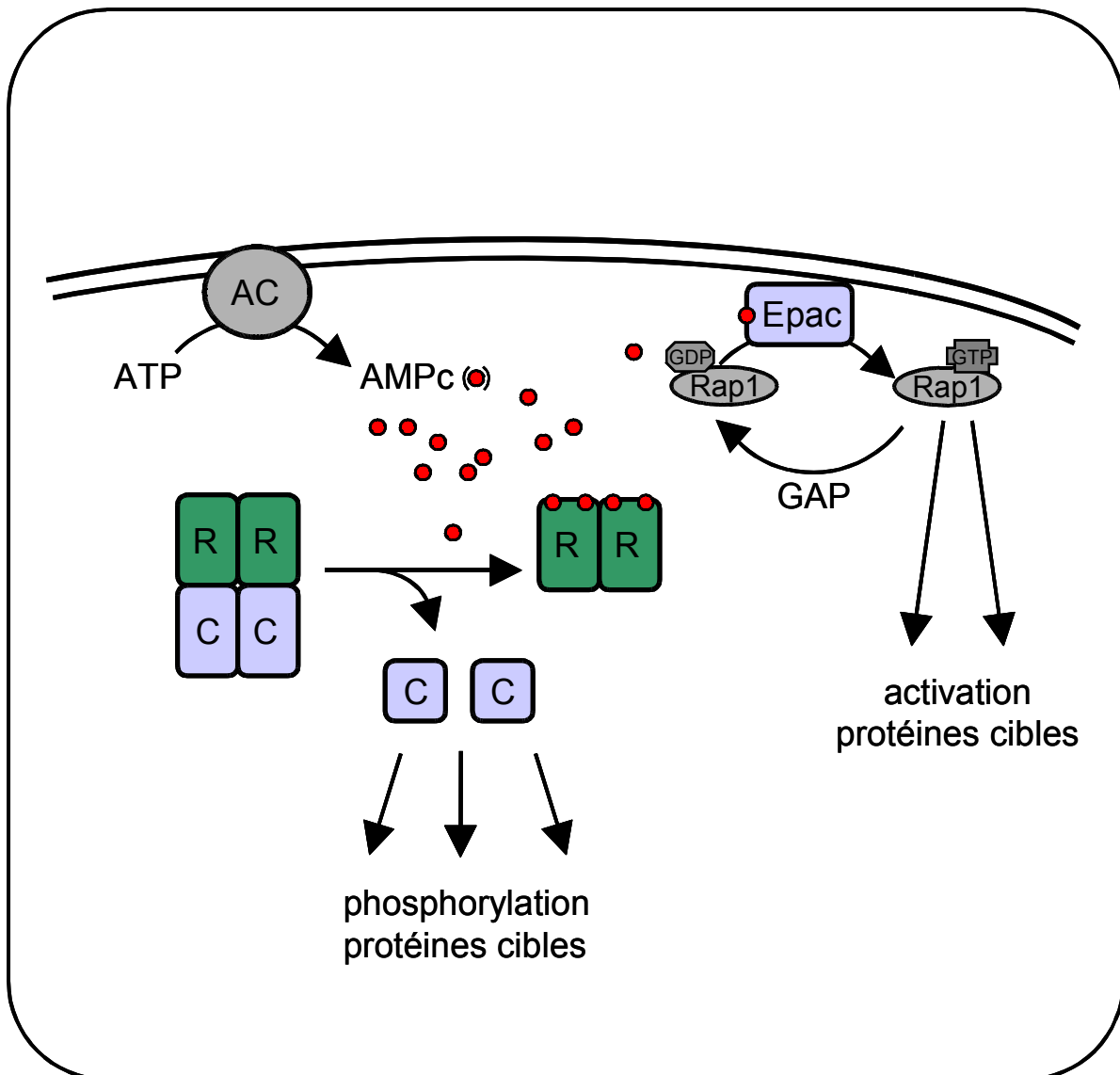


Figure 2: Récepteurs intracellulaires de l'AMPc. La production de l'AMPc par les adénylate cyclases (AC) entraîne une augmentation intracellulaire d'AMPc. La liaison de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices de la PKA(R) diminue leurs affinités pour les sous unités catalytiques (C) qui se dissocient. L'activation directe du facteur d'échange Epac par l'AMPc stimule la protéine G monomérique Rap.

Les récepteurs qui activent la PKA, par l'intermédiaire de la production d'AMPc, régulent un large éventail de processus cellulaires comme le métabolisme (Krebs et Beavo, 1979), la régulation de gènes (Roesler et coll., 1988), la croissance cellulaire et la division (Dumont et coll., 1989), la différenciation (Liu, 1982) mais aussi la conductivité des canaux ioniques (Li et coll., 1993).

En fonction du cycle cellulaire, le comportement cellulaire change si le taux d'AMPc reste élevé : beaucoup de cellules se différencient, certaines cellules prolifèrent et d'autres meurent. La régulation de la prolifération cellulaire par l'AMPc a fait l'objet de nombreuses études et selon le modèle cellulaire utilisé, l'AMPc est décrit comme un inhibiteur de la prolifération (Huttner et coll., 1996; Kurino et coll., 1996; Noveral et Grunstein, 1994) si bien qu'il est admis qu'une augmentation d'AMPc intracellulaire réduit souvent la croissance cellulaire (Ralph, 1983). D'autres études montrent, à l'inverse, que l'AMPc stimule la prolifération cellulaire (Della Fazia et coll., 1997; Roger et coll., 1983). Aussi la voie de l'AMPc est mitogène dans les kératynocytes (Marcelo, 1979) dans les hépatocytes (Armato et coll., 1974; Bronstad et Christoffersen, 1980) et dans les cellules de la glande mammaire (Taylor-Papadimitriou et coll., 1980; Yang et coll., 1980).

Dans la glande thyroïde, l'AMPc régule positivement l'ensemble des processus cellulaires. Le myocarde est un muscle dont la fonction est aussi stimulée par l'AMPc. Nous avons donc pris comme sujet d'étude le thyrocyte et le cardiomyocyte, deux types cellulaires hautement spécialisés qui sont régulés de manière positive par les voies de l'AMPc.

B. La glande thyroïde et le thyrocyte

La thyroïde est une glande endocrine régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire dont la fonction est essentielle au maintien de l'homéostasie générale, mais également au développement de nombreux organes et tissus, tels que le système nerveux central dans la période fœtale et néonatale.

Impaire et médiane, la glande thyroïde se situe dans la région cervicale antérieure, en dessous du larynx et en avant des premiers anneaux trachéaux. La thyroïde est constituée de deux lobes reliés par un isthme (figure 3.A). Le tissu thyroïdien (figure 3.B) est composé d'unités morpho-fonctionnelles sphériques, d'environ 200 µm de diamètre chez l'Homme : les follicules. Ils sont formés d'une cavité étanche renfermant une substance amorphe riche en thyroglobuline (Tg) : la colloïde. Les follicules sont délimités par un épithélium unistratifié à

jonctions serrées constitué par des cellules polarisées : les thyrocytes (figure 3.C). D'origine endodermique, les thyrocytes représentent pratiquement la totalité du parenchyme thyroïdien (99,9%). Ils présentent un pôle apical au contact avec la colloïde, et un pôle baso-latéral en relation avec le réseau sanguin sous-jacent, leur permettant ainsi une double fonction sécrétoire :

- . exocrine : synthèse, sécrétion et stockage de la Tg dans la cavité folliculaire,
- . endocrine : synthèse et sécrétion des hormones thyroïdiennes la thyroxine (T4), et de la tri-iodothyronine (T3) dans la circulation sanguine.

La fonction sécrétoire ainsi que les principaux processus cellulaires du thyrocyte sont régulés par la TSH.

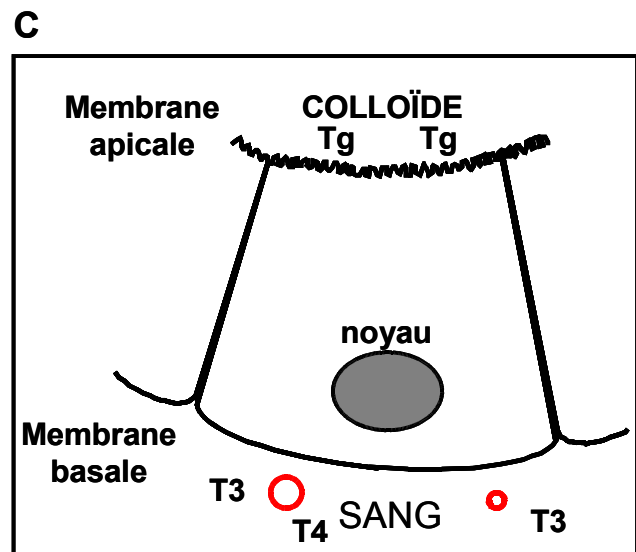
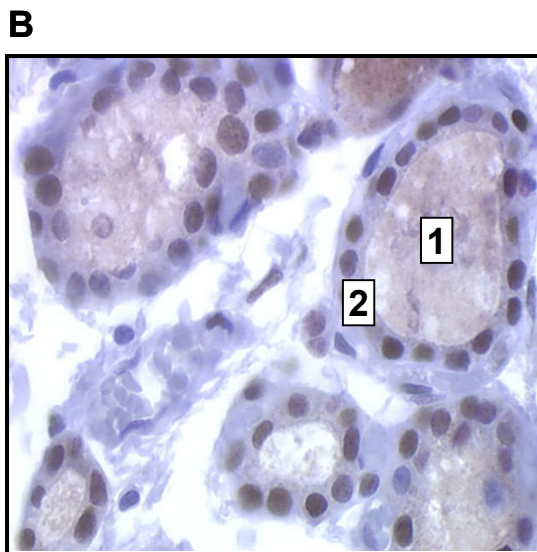
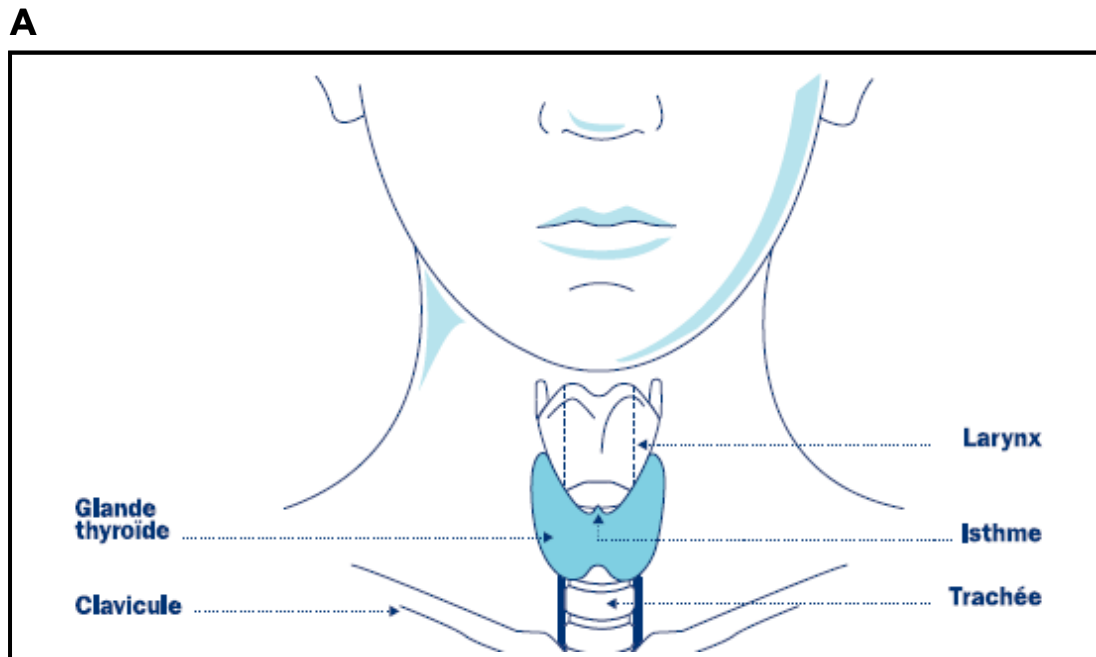


Figure 3: La glande thyroïde et le thyrocyte. A) La glande thyroïde est positionnée en avant de la trachée sous le larynx. L'isthme relie les deux lobes de la glande. B) Le parenchyme thyroïdien est parsemé de follicules ressemblant à des sphères creuses. Ces dernières sont constituées d'une cavité close qui contient la colloïde (1) et qui est entourée d'une monocouche de thyrocytes (2). C) Le thyrocyte est une cellule polarisée. Au niveau de sa membrane apicale, il sécrète la thyroglobuline dans la colloïde. Les hormones thyroïdiennes, T3 et T4, sont secrétées au niveau du pôle baso-latéral dans le circulation sanguine (cercles rouges).

B) Pomérançe, photo non publiée.

C. Régulation du thyrocyte par la TSH

1. Structure et production de la TSH

La TSH est une glycoprotéine de 28 kDa (kiloDa). Elle est formée de deux sous-unités, α et β , glycosylées et unies par des liaisons non covalentes. Seule la sous-unité β confère à la TSH sa spécificité biologique et immunologique, la sous-unité α étant commune aux autres hormones glycoprotéiques (l'hormone folliculo-stimulante, l'hormone lutéinisante, l'hormone chorionique gonadotrope) (Ryan et coll., 1988).

La TSH est produite par les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse. Chez l'Homme, le taux de production de la TSH est de l'ordre de 50 à 200 mU par jour (Odell et coll., 1967). Les régulations majeures de la production de la TSH sont représentées par l'action stimulatrice de l'hormone thyrotrope et par l'effet inhibiteur des hormones thyroïdiennes qui sont essentielles à l'homéostasie des taux circulants de TSH. Ainsi, dans le cas d'hypothyroïdisme, lorsque la production des hormones thyroïdiennes est réduite voire absente, les taux de TSH peuvent atteindre 4000 mU par jour.

2. Le récepteur de la TSH

Le récepteur de la TSH (TSHR) a été cloné en 1989 (Parmentier et coll., 1989). Il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques et il est inséré dans la membrane baso-latérale du thyrocyte. La purification du TSHR par immuno-affinité, en utilisant des anticorps monoclonaux, a permis de montrer que le récepteur est un hétérodimère comprenant deux sous-unités associées par des ponts disulfures qui résultent d'un clivage post-traductionnel : une sous-unité α d'environ 53 kDa et une sous-unité β (de 33 à 42 kDa) (Loosfelt et coll., 1992) (figure 4).

La séquence peptidique du récepteur, déduite de la séquence de l'ARNm, comprend 764 aa avec un peptide signal de 21 résidus et un poids moléculaire calculé de la protéine mature de 85 kDa qui ne tient pas compte des modifications post-traductionnelles. Le domaine à sept passages trans-membranaires (domaine serpentine) composé de 266 aa, est impliqué dans la transmission du signal hormonal. Un volumineux domaine extracellulaire (ectodomaine), de 394 aa, est impliqué dans la liaison à la TSH. Ce domaine est impliqué dans un processus d'inhibition du domaine serpentine qui maintient l'activité du TSHR à un niveau basal en

absence de TSH. Lors de sa liaison au TSHR, la TSH stabilise un changement de conformation de l'ectodomaine qui active le domaine serpentine (Vassart et Costagliola, 2004; Vassart et coll., 2004). Le domaine intracellulaire comprend 83 aa dont plusieurs résidus sérines et thréonines, sites potentiels de phosphorylation qui interviennent dans la régulation de l'activité du TSHR (Kursawe et Paschke, 2007) (figure 4).

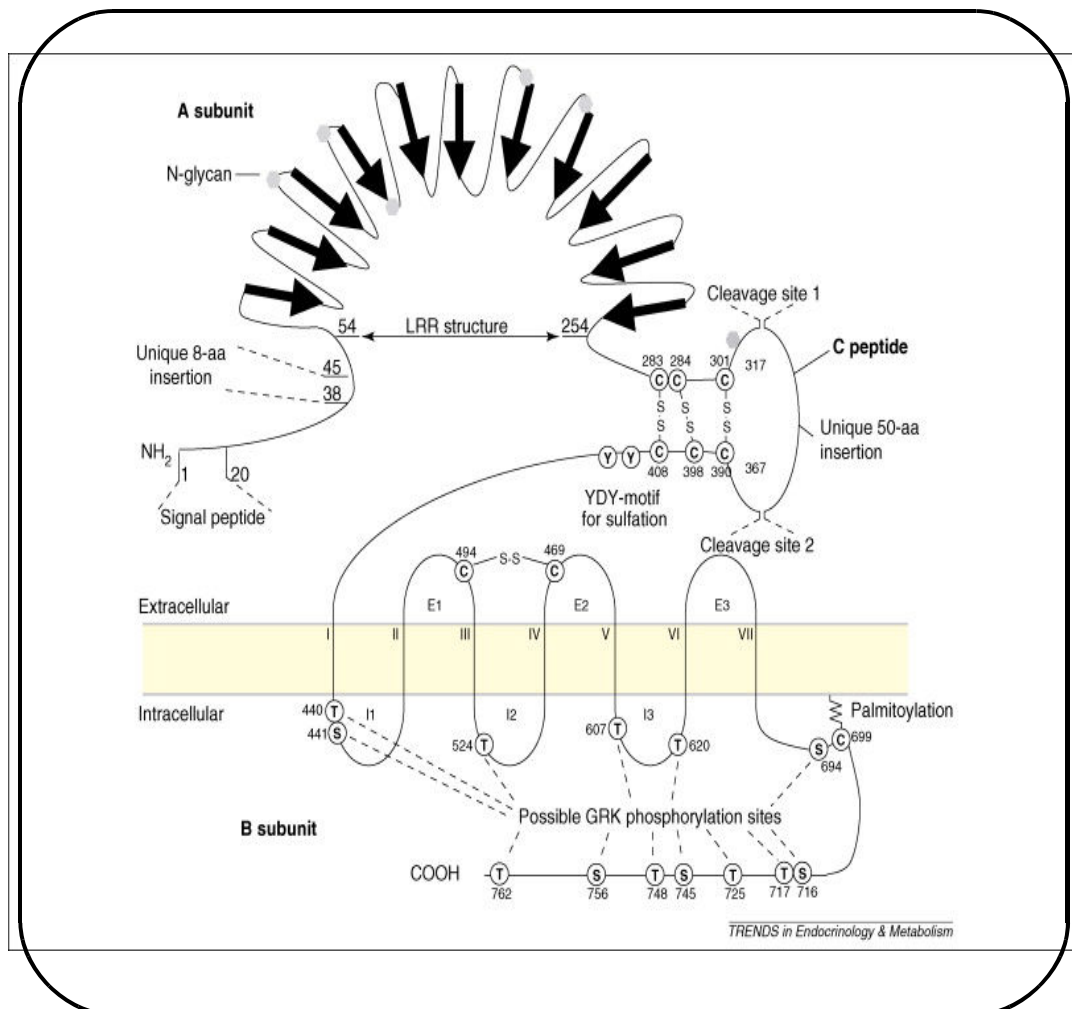


Figure 4: Le TSHR. Le large domaine extracellulaire (400 aa) est caractéristique des récepteurs des hormones glycoprotéiques; Deux insertions de 8 aa et 50 aa sont propres au TSHR. Le domaine extracellulaire clivé reste en contact avec la partie c-terminale par des ponts disulfures. Les chiffres romains (I-VII) indiquent les domaines transmembranaires (extrait de Kursawe et Paschke, 2007).

La liaison au TSHR, par son ligand naturel, la TSH, conduit principalement à l'activation de la protéine Gs qui entraîne la stimulation de l'AC. Cependant, il a été rapporté que le TSHR pouvait aussi se lier aux protéines hétérotrimériques G_i , G_o , G_q et $G_{12/13}$ (Laugwitz et coll., 1996).

Il a été montré que l'EC50 (la concentration effective prise à 50 % d'un effet) de l'AC se situe autour de 0,3-0,4 mU de TSH/mL (Van Sande et coll., 1990) et que la constance de dissociation de la TSH se situe autour de 1,5-1,8 mU (Costagliola et coll., 1992). Bien que la constance de dissociation pour la TSH soit exprimée en unité de bioactivité (mU/mL), il est admis que la valeur en termes de molarité soit de l'ordre du nanomolaire. Chez l'Homme, la TSH est capable d'activer la phospholipase C (PLC), laquelle génère la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG) (Laurent et coll., 1987). Cependant, l'EC50 pour l'activation de cette voie est d'environ 5 mU de TSH /mL, il est donc plus haut que celui nécessaire pour l'activation de la voie de l'AMPc. La capacité du récepteur à activer l'AC et la PLC est une propriété intrinsèque du récepteur étant donné que l'expression du récepteur dans les cellules CHO (« chinese hamster ovary cells ») génère l'activation des deux voies (Van Sande et coll., 1990).

L'autorégulation de l'activité du TSHR intervient dans la terminaison du signal. Après deux heures d'exposition de TSH sur des cellules thyroïdiennes de chien en culture, on observe une désensibilisation du TSHR avec une baisse de l'activité de l'AC (Deery et Rani, 1991). De même, dans la lignée de cellules thyroïdiennes de rat FRTL-5 (Fisher rat thyroid cell line), un traitement avec la TSH entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm du TSHR. Cet effet est dépendant de l'AMPc et il nécessite la présence ou non d'insuline (INS) ou de sérum (Saji et coll., 1991). Cette inhibition du TSHR par la TSH est un mécanisme transcriptionnel car il a été observé une diminution de l'expression des facteurs de transcription, se liant sur le promoteur du TSHR, comme TTF-1 (thyroid transcription factor-1) (Medina et coll., 2000) et SSBP (single strand-binding protein) (Ohmori et coll., 1996).

Par ailleurs, un mécanisme de rétro-contrôle serait impliqué dans la désensibilisation du TSHR. Ce mécanisme met en jeu d'autres protéines, la kinase associée au récepteur, la GRK (G protein-coupled receptor kinases), et une beta-arrestine. En effet, des expériences effectuées sur le modèle des cellules FRTL-5 indiquent que le TSHR est phosphorylé par GRK2 ou GRK5 et conduit à sa liaison avec l'arrestine $\beta 1$, ce qui empêche l'activation de Gs (Iacovelli et coll., 1996; Nagayama et coll., 1996).

Des mutations somatiques ou germinales du TSHR ont été identifiées, conduisant à une activation constitutive du récepteur et qui sont impliquées dans la pathogénèse de nombreuses maladies thyroïdiennes. Par ailleurs, des mutations qui entraînent la perte de fonction du récepteur ont été décrites et sont responsables de différents phénotypes pathologiques pouvant conduire à un hypothyroïdisme congénital (Duprez et coll., 1999). Une observation clinique indique un gain de fonction de la cascade de l'AMPc : les patients atteints du syndrome de McCune-Bright sont porteurs de mutations Gs (Gsp) qui conduisent à l'activation constitutive de l'AC. Cela peut alors conduire au développement d'adénomes toxiques (Weinstein et coll., 1991).

3. La voie de signalisation de l'AMPc

a. Activation du signal AMPc

La voie de l'AMPc (AMPc/Gs/PKA) dans la thyroïde correspond, depuis qu'elle a été caractérisée, au modèle canonique de la cascade des récepteurs β -adrénergiques (Fraser, 1991). La voie de l'AMPc est activée au niveau des récepteurs spécifiques de la TSH dans toutes les espèces mais aussi par les récepteurs β -adrénergiques et par les récepteurs à la prostaglandine E (PGE) dans le thyrocyte humain, avec cependant des cinétiques différentes : l'activation est prolongée avec la TSH tandis qu'elle est plus courte avec la norépinephrine ou les PGE (Van Sande et coll., 1980).

L'AMPc, dans les conditions basales, présente une concentration stationnaire, résultant de l'activité intrinsèque du récepteur non-activé et de l'action des phosphodiesterases qui hydrolyse l'AMPc (Conti, 2000).

La protéine Gs est présente dans le tissu thyroïdien humain, les thyrocytes de chien et les cellules FRTL-5 (Laugwitz et coll., 1996). Les données concernant les différentes isoformes d'AC exprimées dans la thyroïde sont encore incomplètes. Dans les thyrocytes de chien et d'Homme, il a été montré par RT-PCR et par western-blot que trois isoformes d'AC sont principalement exprimées (type III, type VI et type IX) (Vanvooren et coll., 2000).

La PKA est formée de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Il existe deux isoenzymes pour la PKA : l'isoforme I et l'isoforme II. Elles diffèrent par leurs sous unités régulatrices : RI ou RII. L'isoforme I est plus sensible à l'AMPc. Il existe différentes isoformes, deux RI (RI α et RI β) et deux RII (RII α , RII β),

lesquelles sont codées par quatre gènes différents (Skalhegg et Tasken, 2000). Une étude a montré que la PKA avait un rôle distinct dépendant de l'isoforme pour la régulation des gènes ou pour la stimulation de la croissance par la TSH. En particulier, l'isoforme RII β de la sous-unité régulatrice de la PKA est fortement impliquée dans la signalisation de la TSH alors que l'isoforme I serait impliquée dans les régulations post-transcriptionnelles telle que la capture de l'iodure et dans les dialogues avec d'autres voies de signalisation comme les MAPK (mitogen-activated protein kinase) ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Calebiro et coll., 2006).

La TSH, via l'AMPc, contrôle non seulement l'expression des isoformes de la PKA, en particulier la PKA I (Breton et coll., 1989) mais aussi leur localisation intracellulaire par leur ancrage à divers organites par des « A kinase anchor proteins » (AKAP).

C'est le cas de l'AKAP121 qui lie et concentre PKA II à la face cytoplasmique des mitochondries (Felicciello et coll., 1998), laquelle serait impliquée dans la survie cellulaire en phosphorylant la protéine pro-apoptotique « bad » sur la sérine 155 (Felicciello et coll., 2005) (Figure 5). L'AKAP95 peut interagir avec la sous unité RII α de la PKA ce qui permet son interaction avec les cyclines D1 et D3 de la phase G1/S du cycle cellulaire (Arsenijevic et coll., 2006) (Figure 5).

L'AMPc lie donc la PKA au niveau de ses sous-unités régulatrices, ce qui provoque la dissociation de l'enzyme et active les sous-unités catalytiques. Celles-ci, parmi leurs divers substrats, phosphorylent en particulier les facteurs de transcription de la famille CREB/ATF-1 (cAMP response element (CRE) binding protein/activating transcription factor 1) qui vont réguler la transcription au niveau de séquences CRE présentes sur de nombreux promoteurs de gènes. Par exemple, la phosphorylation de CREB sur la sérine 133 permet sa liaison à un coactivateur de type CBP (« CREB binding protein ») ou p300, lesquels interagissent avec la machinerie générale de la transcription (Mayr et Montminy, 2001) (figure 5).

Dans la thyroïde, quelques données de la littérature indiquent des substrats phosphorylables par la PKA. Ainsi dans les cellules FRTL-5, la sous-unité alpha p85 de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (De Gregorio et coll., 2007), la sous-unité p65 (RelA) du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) (Cao et coll., 2005), le Rétinoblastome (Medina et coll., 2000b) et la PDE4D3 (Oki et coll., 2000; Sette et Conti, 1996) sont

phosphorylés en réponse à la TSH et cet effet est dépendant de la PKA. Aussi, la TSH, par l'intermédiaire de la PKA, phosphoryle Rap1A dans les cellules WRT (« Wistar rat thyroid cell line ») (Tsygankova et coll., 2001) et Rap1B (Lou et coll., 2002) dans les cellules PCCL3, une lignée de cellules épithéliales thyroïdiennes dérivée de rats Fisher adultes.

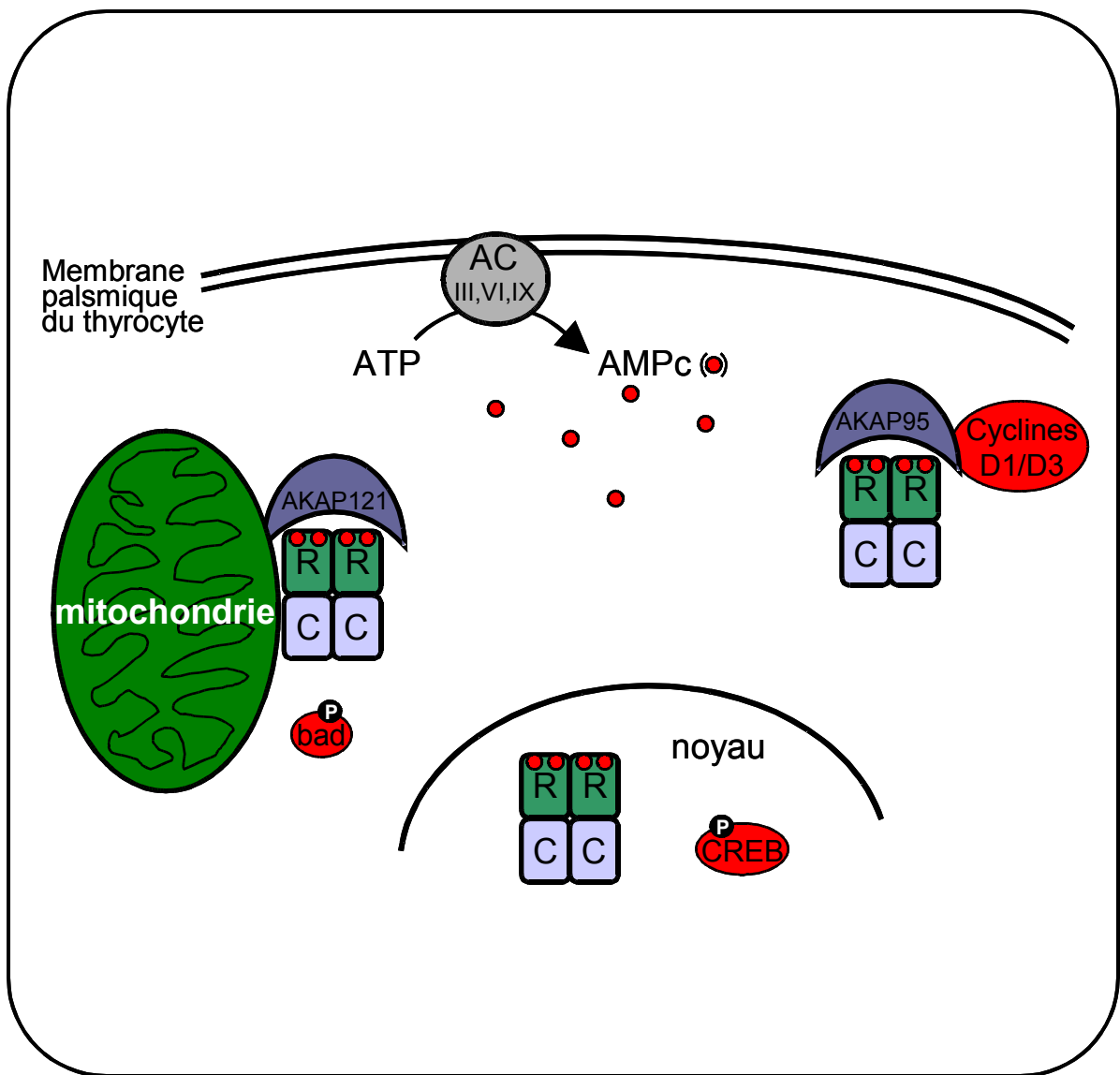


Figure 5: Le signal AMPc/PKA dans le thyrocyte.

L'autre voie qui est activée par l'AMPc est la voie d'Epac. Il a été montré dans les thyrocytes de chien en culture que l'AMPc peut activer la voie d'Epac (Dremier et coll., 2000) mais que cette voie n'est pas impliquée dans la régulation du thyrocyte par la TSH (Dremier et coll., 2007). Dans les cellules thyroïdiennes WRT, la TSH stimule la phosphorylation de la sérine-thréonine kinase Akt et cet effet est dépendant d'Epac. En effet, dans les cellules WRT qui expriment Rap163E, un mutant constitutivement actif de Rap1, la phosphorylation d'Akt en réponse à la TSH est augmentée (Mei et coll., 2002). Récemment, il a été montré, dans des cellules thyroïdiennes PCCL3 que les voies cAMP-Epac-Rap1B et PKA sont impliquées dans la régulation d'Akt en formant un complexe avec la « Protein phosphatase 2A » (PP2A) (Hong et coll., 2008). Une autre étude a montré une synergie entre Epac et la PKA dans la prolifération des cellules PCCL3 stimulée par la TSH (Hochbaum et coll., 2008).

Il est clairement établi que l'AMPc est responsable de tous les effets de la TSH dans la régulation du thyrocyte (Dumont et coll., 1992) (Figure 6). Pharmacologiquement, la production d'AMPc peut être générée par la forskoline (FSK), un diterpène produit par une plante indienne (Coleus forskohlii) qui active directement l'AC ce qui permet une augmentation intracellulaire d'AMPc (Seamon et coll., 1981). Ainsi, il est courant d'utiliser *in vitro* la FSK pour étudier les effets de la TSH (Roger et Dumont, 1984).

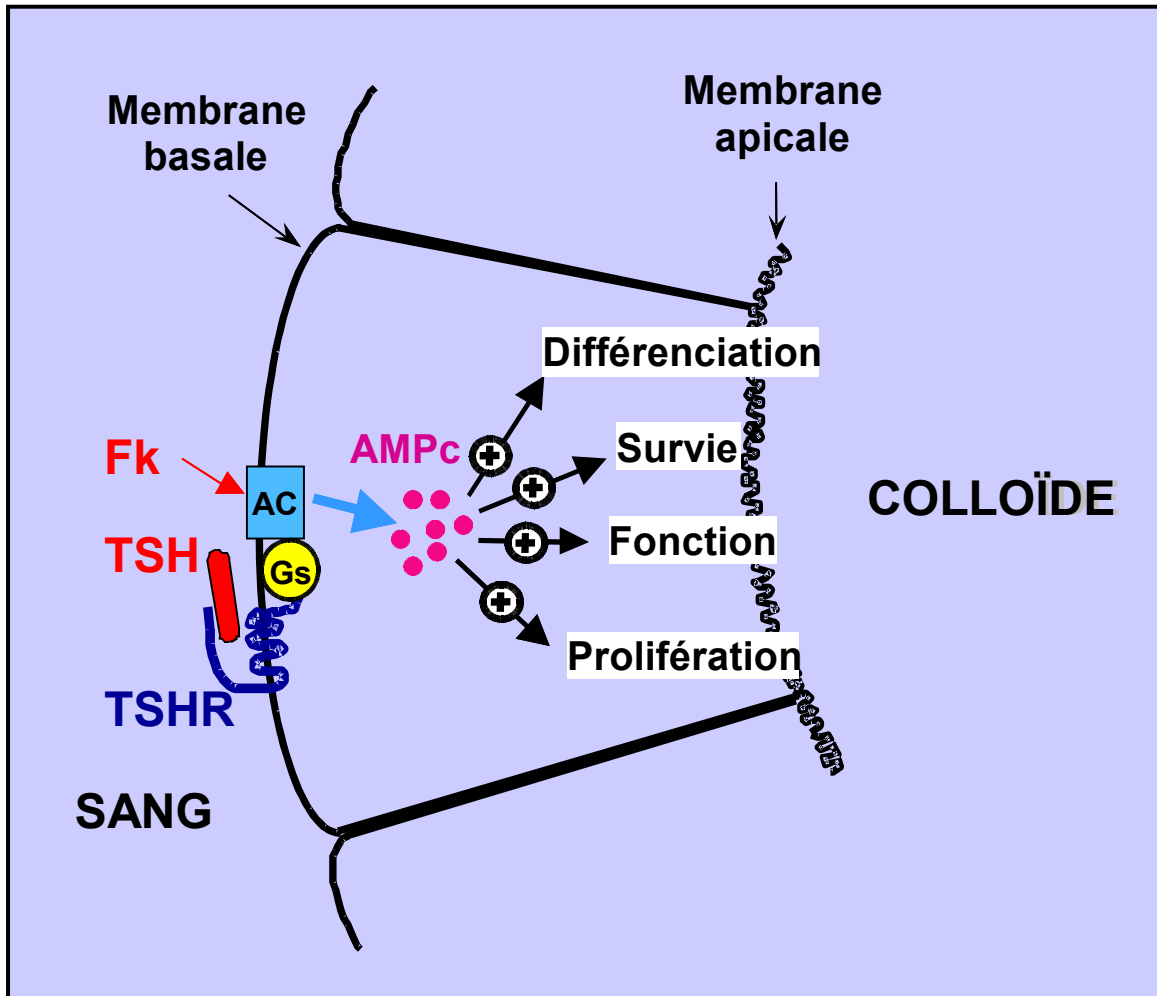


Figure 6: Rôle majeur de la voie de l'AMPc dans la régulation du thyrocyte par la TSH.

b. Inhibition du signal AMPc

La terminaison du signal est régulée à de nombreux niveaux. Les PDE terminent le signal de l'AMPc en l'hydrolysant sous une forme inactive : l'AMP (figure 1). En particulier la classe des PDE4 qui sont sélectivement inhibées par le rolipram, sont régulées positivement par la TSH de façon dépendante de l'AMPc (Mehats et coll., 2002; Nemoz et coll., 1995; Sette et coll., 1994). En particulier, l'isoforme PDE4D3 est régulée par phosphorylation par la voie TSH/AMPc/PKA (Oki et coll., 2000). De plus, la TSH stimule, à plus long terme, l'expression des PDE4 dans les cellules thyroïdiennes FRTL-5 (Takahashi et coll., 2001). Au niveau fonctionnel, l'inhibition pharmacologique des PDE4 entraîne une diminution de la synergie entre la TSH et l'INS au cours de la progression du cycle cellulaire. Ainsi, l'incorporation de ³H-thymidine et l'activité des « Cyclin-dépendant kinase » (CDK) sont fortement affectées par l'inhibition des PDE4 (Takahashi et coll., 2001).

4. Régulation de la fonction

La fonction de la glande thyroïde est de produire (synthèse et sécrétion) les hormones thyroïdiennes. La TSH stimule la fonction du thyrocyte en influençant toutes les étapes de la synthèse et de la sécrétion des hormones thyroïdiennes (Dunn et Dunn, 2001).

Le transport de l'iodure à travers la membrane baso-latérale des thyrocytes est une étape clef de la biosynthèse hormonale. Cette étape est sous la dépendance directe du symporteur Na⁺/I⁻ (NIS) (Nilsson et coll., 1992). En effet, il capte l'iodure qui diffuse au pôle apical de la cellule et sera ensuite stocké dans la colloïde grâce à un transporteur spécifique : la pendrine (Rodriguez et coll., 2002). Les ions iodure subiront une organification par la thyropéroxydase (TPO) (Nunez et Pommier, 1982). Cette réaction consiste en leur oxydation grâce au peroxyde d'hydrogène fourni par une NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase (DUOX, Dual Oxydase) (Virion et coll., 1984) et à leur fixation sur les résidus tyrosines de la thyroglobuline (Tg). La Tg porte alors des acides aminés (aa) iodés monoiodotyrosine et diiodotyrosine (Deshpande et Venkatesh, 1999). La TPO catalyse le couplage des iodotyrosines pour donner des iodotyronines. La Tg iodée sera alors endocytée et protéolysée, conduisant à la formation puis à la sécrétion dans le sang au niveau du pôle basal d'une pro-hormone, la T4. Celle-ci est convertie en T3 active dans les cellules par des déiodinases.

5. Régulation de la différenciation

La fonction du thyrocyte nécessite un état différencié qui implique l'expression de gènes spécifiques. L'AMPc contrôle l'expression des gènes hautement spécifiques du thyrocytes comme la Tg, la TPO, le NIS, le TSHR et la DUOX (Gerard et coll., 1988; Nagayama et coll., 1989; Van Heuverswyn et coll., 1985). Ainsi, la Tg est régulée au niveau transcriptionnel par l'activation dépendante de la TSH de deux facteurs de transcription : TTF-1 (Mascia et coll., 1997) et Pax 8 (Pasca di Magliano et coll., 2000). Ces deux facteurs de transcription interagissent directement et activent de manière synergique la transcription (Di Palma et coll., 2003). De la même manière que pour la régulation du gène de la Tg, le gène de la TPO est régulé positivement par la TSH et cette régulation implique la combinaison de TTF-1 et Pax 8 qui agissent synergiquement sur la transcription (Miccadei et coll., 2002). La régulation de l'expression du gène du NIS par la TSH est sous la dépendance d'une région activatrice distale nommée NUE pour « NIS upstream enhancer » du promoteur du NIS qui contient des éléments de réponse pour TTF-1, Pax 8 et CREB (Taki et coll., 2002).

6. Régulation de la prolifération

Il a été démontré qu'une prolifération lente mais significative, existait au sein des cellules folliculaires humaines et canines. Ainsi, chez l'adulte, le taux de renouvellement des cellules est de l'ordre de 8,5 années, ce qui correspond à un renouvellement de cinq fois chez l'adulte (Coclet et coll., 1989).

Dans la thyroïde, au moins trois familles de voies de signalisation mitogéniques sont clairement définies : la voie Gs/AC/AMPc/PKA, la voie des récepteurs hormonaux couplés à Gq/PLC et la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase qui sont activés par les facteurs de croissance (Dumont et coll., 1992; Takasu et coll., 1990). Selon le facteur de croissance, la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase peut être divisée en deux catégories : Certains facteurs de croissance, comme l'EGF (epidermal growth factor), induisent la prolifération et répriment l'expression de la différenciation. D'autres facteurs de croissance, comme le FGF (fibroblast growth factor) ou l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) / INS, n'inhibent pas la différenciation et sont, soit mitogènes, soit nécessaires à la prolifération en combinaison avec d'autres stimuli qui ne sont pas mitogènes eux-mêmes (Pohl et coll., 1990).

Dans les cellules thyroïdiennes, l'IGF-1 est nécessaire pour l'action mitogène de la TSH. Cet effet de l'IGF-1 peut être reproduit *in vitro* par la liaison de basse affinité de l'INS sur le récepteur de l'IGF-1 en utilisant de forte concentration d'INS. De plus, le récepteur de l'INS

est induit par la TSH dans les thyrocytes humains et canins, ce qui permet à l'INS d'agir à des concentrations physiologiques dans l'effet prolifératif de la TSH (Van Keymeulen et coll., 2000).

La TSH stimule la prolifération des thyrocytes canins et humains tout en maintenant l'expression de la différenciation. Tous les effets prolifératifs de la TSH sont reproduits par des modulateurs positifs non-spécifiques de la voie de l'AMPc tels que la toxine cholérique, la FSK ou les analogues de l'AMPc (Roger et coll., 1988). Cette régulation est donc sous la dépendance de la production intracellulaire de l'AMPc en association avec l'IGF-1 ou l'INS (Deleu et coll., 1999) (figure 7). La phosphorylation et l'activation de la voie mTOR / p70S6K (mammalian target of rapamycin / p70 ribosomal protein S6 kinase) constituent un point de convergence entre les voies mitogènes de l'AMPc avec celles activées par les facteurs de croissance (Coulonval et coll., 2000).

Les signaux mitogènes régulent la progression du cycle cellulaire chez les mammifères en stimulant l'accumulation des cyclines D, lesquelles s'assemblent avec les cdk 4 et 6 et les activent. Ces complexes agissent au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire et permettent la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Bartek et coll., 1996).

D. Les autres facteurs de régulation du thyrocyte

Les facteurs de croissance tels que l'IGF-I, l'EGF et le FGF possèdent des récepteurs spécifiques exprimés à la surface du thyrocyte et un certain nombre de leurs effets ont été observés. Ainsi, l'IGF-I, agit de concert avec la TSH dans la prolifération des cellules thyroïdiennes (figure 7). Il a été aussi décrit que l'EGF stimule la synthèse d'ADN (acide désoxyribonucléique) mais inhibe la fonction dans les thyrocytes. Enfin, le FGF est décrit comme stimulant la prolifération des cellules thyroïdiennes (Dumont et coll., 1992).

Les cytokines produites localement telles que le $TNF\alpha$, l' $IFN\gamma$ (Interféron- γ) et l'IL-1, sont décrites comme influençant la fonction, la croissance, et la différenciation des thyrocytes *in vitro* (Zakarija et McKenzie, 1989), mais aussi *in vivo* (Ajjan et coll., 1996). A l'inverse des facteurs de croissance, ces cytokines inhibent la prolifération des cellules FRTL-5 (Patwardhan et Lombardi, 1991) et la croissance des follicules thyroïdiens de rat en culture (Simons et coll., 1998).

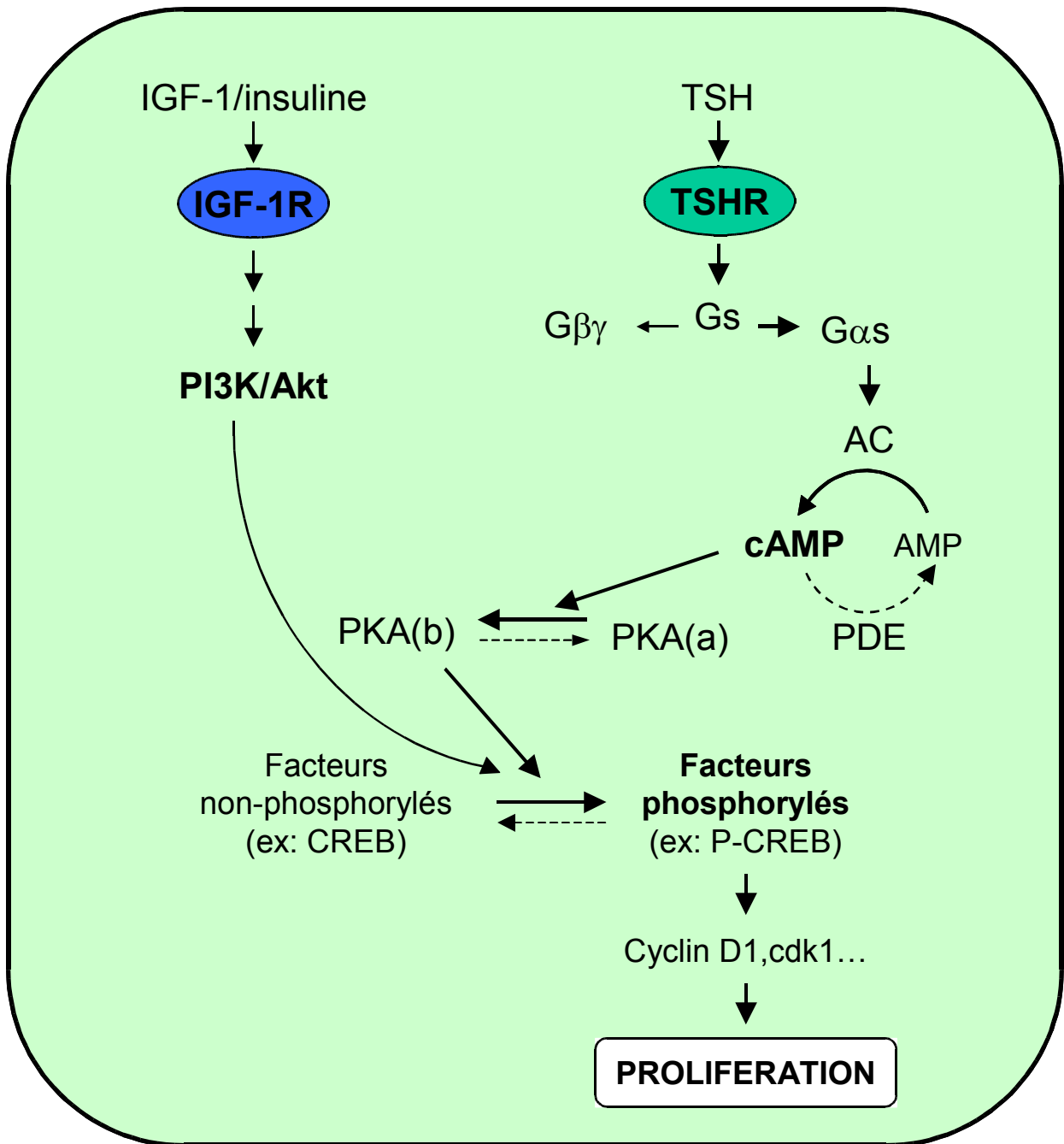


Figure 7: Schéma de la signalisation de l'activation du TSHR et de l'IGF-1R dans la régulation de la prolifération du thyrocyte. Les flèches en gras représentent la voie classique du TSHR activé conduisant à la régulation de la prolifération. Les flèches normales intègrent les protéines interagissant avec la voie classique du TSHR activé. Les flèches hachurées indiquent un retour à l'état non-activé. PKA(a): PKA inactive; PKA(b):PKA active; P-CREB: phospho-CREB.

E. Maladies auto-immunes thyroïdiennes : anticorps stimulants et bloquants

Les maladies auto-immunes thyroïdiennes sont les pathologies thyroïdiennes les plus courantes. Elles sont caractérisées par l'infiltration de la glande de lymphocytes T et B, de cellules dendritiques et de macrophages qui génèrent des signaux pathologiques extracellulaires (comme des cytokines et des anticorps) dont le rôle est important dans l'établissement des maladies auto-immunes thyroïdiennes (Stassi et De Maria, 2002).

Au cours de la thyroïdite d'Hashimoto, les lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs recrutent les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8⁺ dans le tissu thyroïdien. A la fois, les auto-anticorps et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont responsables de la progression de la maladie qui conduit à la mort des cellules thyroïdiennes et donc à un hypothyroïdisme (figure 8.A). Les auto-anticorps bloquant le TSHR la thyroïde (TBAb) se lient aussi aux récepteurs de la TSH mais ne l'activent pas et se comportent donc comme des inhibiteurs compétitifs de l'hormone (la TSH) (Chiovato et coll., 1990). De tels auto-anticorps sont responsables de certains cas d'hypothyroïdisme de la glande (Iitaka et coll., 2001). De plus, l'infiltrat lymphocytaire conduit à la sécrétion d'anticorps dirigés contre des marqueurs de différenciation du thyrocyte (comme la TPO par exemple), lesquels fixent le complément, ce qui conduit à la destruction du tissu thyroïdien (Weetman et McGregor, 1994) (Figure 8.A).

Dans la maladie de Basedow (« Graves' disease »), les lymphocytes T CD4⁺ induisent la sécrétion par les lymphocytes B des auto-anticorps stimulants de la thyroïde (TSAb) lesquels sont dirigés contre le TSHR (Figure 8.B). Les TSAb se lient aux récepteurs de la TSH et activent la voie de l'AMPc (Laurent et coll., 1991). Ils reproduisent ainsi les effets stimulants de la TSH sur la fonction et la croissance du tissu. Leur production anormale est responsable de l'hyperthyroïdisme et du goitre dans la maladie de Basedow (figure 8.B). Un modèle de souris transgéniques qui expriment le récepteur pour l'adénosine A2a qui est placé sous le contrôle du promoteur du gène de la Tg a permis d'étudier l'effet de l'activation permanente de la voie de l'AMPc. En conséquence, ces souris développent un hyperthyroïdisme sévère avec un goitre prononcé (Ledent et coll., 1996). Ce modèle montre un rôle *in vivo* de l'AMPc dans la mise en place des maladies hyper-fonctionnelles et prolifératives de la glande thyroïde.

Les données de la littérature indiquent que l'AMPc favorise l'action des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules qui répondent de manière positive à l'AMPc. Cependant l'AMPc possède aussi des propriétés anti-inflammatoires au niveau des cellules du système inflammatoire qui se traduit, en autres, par une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires (Lee et coll., 1988; Renz et coll., 1988). Cette différence de propriété peut s'expliquer par le fait que dans ces cellules, l'augmentation de l'AMPc est plutôt inhibitrice qu'activatrice dans les processus inflammatoires (Eigler et coll., 1998; Moore et Willoughby, 1995). En effet, l'activation de la voie AMPc/PKA inhibe la transcription de certains gènes par le biais de l'activation de CREB, par un mécanisme de compétition avec le facteur de transcription NF- κ B pour l'interaction avec le co-activateur CBP (Parry et Mackman, 1997).

L'hyper-stimulation de la voie AMPc joue donc un rôle important dans la mise en place du processus pathologique.

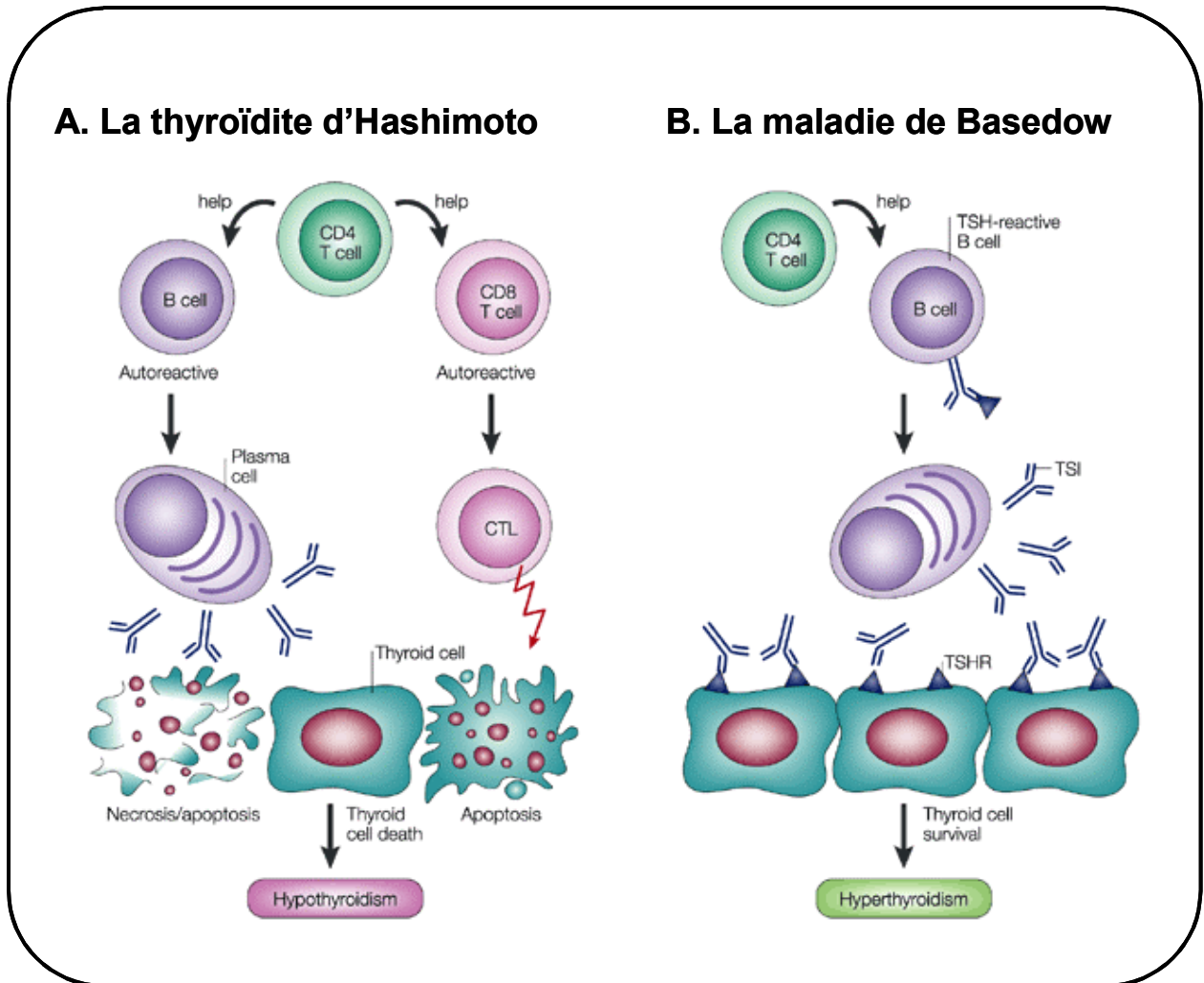


Figure 8: L'auto-immunité thyroïdienne produit 2 processus pathologiquement opposés. TSI: auto-anticorps stimulant la thyroïde (d'après Stassi et De Maria, 2002).

F. Le cœur et le cardiomyocyte

Le cœur est le muscle qui permet de faire circuler le sang à travers tout l'organisme. Chez les mammifères, il est constitué de 4 cavités : deux oreillettes (droite et gauche) et deux ventricules (droit et gauche).

Le sang oxygéné au niveau des poumons arrive dans l'oreillette gauche par les quatre veines pulmonaires, puis il passe dans le ventricule gauche où il est propulsé vers l'ensemble de l'organisme par l'artère aorte. Après la circulation du sang dans l'organisme, les deux veines caves ramènent à l'oreillette droite le sang appauvri en oxygène. Le sang passe ensuite dans le ventricule droit qui l'expulse via les artères pulmonaires vers les poumons où s'effectuera l'échange entre le dioxyde de carbone et l'oxygène.

Le cœur est composé de cellules contractiles appelées cardiomyocytes mais aussi de cellules non contractiles (70 à 80% du nombre total des cellules du cœur) : fibroblastes, cellules adipeuses, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses (constituants des vaisseaux sanguins). Cependant les cardiomyocytes ont une taille importante et ils constituent 70 à 80% de la masse du cœur.

La fonction du cœur est assurée par le cardiomyocyte qui est une cellule musculaire striée (figure 9). Celle-ci se contracte en réponse à une stimulation électrique et est capable de propager cette stimulation par le biais de contacts qu'elle a avec les cellules avoisinantes. Les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires sont spécialisés dans la propagation du potentiel d'action qui aboutit à la contraction.

Les cardiomyocytes possèdent un cytosquelette très développé, organisé en sarcomères. Leur membrane plasmique, le sarcolemme, contient de nombreux canaux qui permettent à la cellule de générer une activité électrique et de faire entrer du calcium (Ca^{2+}), nécessaire à la contraction. Le réticulum endoplasmique, très spécialisé dans les myocytes, appelé réticulum sarcoplasmique (RS), a pour rôle principal de stocker le Ca^{2+} intracellulaire. Enfin, les nombreuses mitochondries transforment l'énergie nécessaire pour la contraction.

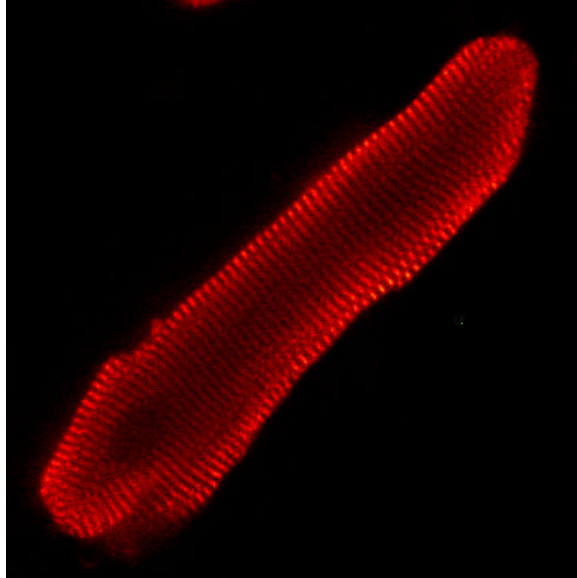


Figure 9: Le cardiomyocyte ventriculaire en culture. Cardiomyocyte ventriculaire de rat adulte en culture observé en microscopie confocale (objectif: X 40). L'actinine sarcomérique, révélée à l'aide d'un anticorps spécifique, apparaît en rouge et elle met en évidence les lignes Z du sarcomère. (Szabo-Fresnais, image non-publiée).

Les hormones telles que l'adrénaline et la noradrénaline (hormones du système adrénergique ou orthosympathique) ou les hormones thyroïdiennes (T3) favorisent la contractilité. Par

contre, les hormones telles que l'acétylcholine (hormone du système cholinergique ou parasympathique) ralentissent le rythme cardiaque.

G. Le couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction est une propriété des cellules musculaires qui regroupe l'ensemble des processus assurant la transformation du stimulus électrique (le potentiel d'action) en un signal intracellulaire qui permet le raccourcissement de la cellule.

Au repos, la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme des fibres musculaires est très basse. L'arrivée du potentiel d'action musculaire au niveau de structures spécialisées va provoquer un flux de Ca^{2+} depuis le RS vers le cytoplasme de la cellule. Le Ca^{2+} libéré par le RS initie un ensemble de mécanismes qui met en jeu les protéines de l'appareil contractile et déclenche, ainsi, la contraction cardiaque.

Plusieurs protéines clés interviennent dans le couplage excitation-contraction qui est présenté Figure 10. Au repos, la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cardiomyocytes est très basse. L'arrivée du potentiel d'action musculaire au niveau du canal calcique de type L ($\text{Ca}_v1.2$) qui est sensible à la variation du voltage résultant du potentiel d'action musculaire provoque un influx de Ca^{2+} vers le cytoplasme de la cellule. Par la suite, le récepteur à la ryanodine (RyR), un canal calcique présent à la membrane du RS est activé et il relargue d'avantage de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Enfin, une Ca^{2+} ATPase, la SERCA (« sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase ») est une pompe à Ca^{2+} dépendante de l'hydrolyse de l'ATP et dont l'activité est modulée par le phospholamban (PLB). Elle permet de restocker le Ca^{2+} dans le RS (Frey et coll., 2000).

Il est bien établi que la production d'AMPc intracellulaire module physiologiquement la fonction contractile des cardiomyocytes. Classiquement, les effets cardiaques de l'AMPc sont attribués à l'activation de la PKA qui phosphoryle plusieurs protéines clés du couplage excitation-contraction parmi lesquelles $\text{Ca}_v1.2$, le PLB, le RyR (Bers, 2002) (Figure 10). De plus, la troponine I (TnI), protéine régulatrice des myofilaments, est une cible de la PKA. Sa phosphorylation par la PKA entraîne une accélération de la vitesse de relaxation (Layland et coll., 2005).

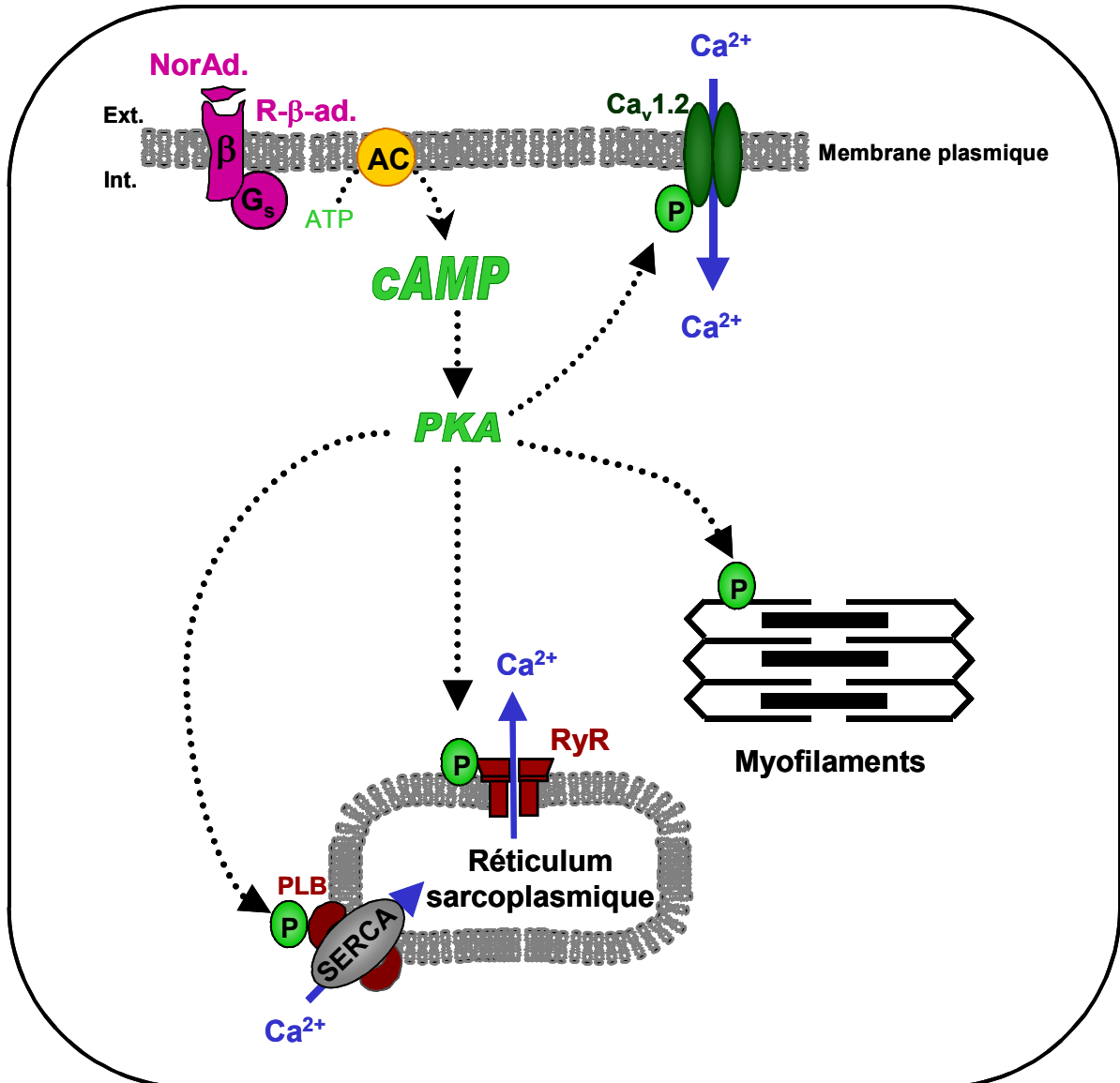


Figure 10: Schéma de la régulation sympathique du couplage excitation-contraction du cardiomyocyte. Ext.: feuillet membranaire extérieur; Int.: feuillet membranaire intérieur.

H. Les catécholamines et sélectivité des récepteurs adrénergiques

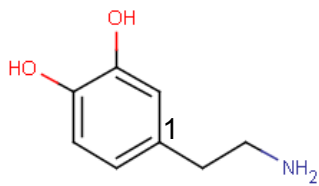
1. Production des catécholamines

Les catécholamines sont des composés organiques synthétisés à partir de la tyrosine. La structure des catécholamines est basée sur un noyau catéchol portant en position 1 une chaîne latérale éthylamine éventuellement substituée (figure 11.A) (Hoffmann et coll., 2004; Rousseau et coll., 1996). La dopamine est le composé le plus simple de la famille des catécholamines, elle possède uniquement une chaîne latérale éthylamine alors que la noradrénaline possède en plus un groupement hydroxyle sur le carbone β de la chaîne latérale. Enfin, l'amine de l'adrénaline est substituée par un groupement méthyle (figure 11.A).

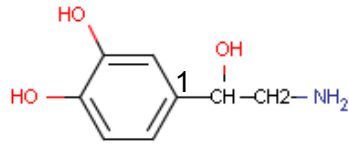
Les catécholamines sont synthétisées par les cellules de la médullosurrénales et par les neurones post-ganglionnaires du système nerveux autonome sympathique. Les catécholamines sont secrétées en réponse à un état émotionnel, un stress, une douleur, une hypoxie, une hypotension ou une exposition au froid. L'adrénaline agit en tant que neurotransmetteur dans le système nerveux central et comme hormone dans la circulation sanguine. L'état de stress qui augmente le taux de catécholamines dans le sang a pour conséquence d'augmenter la fréquence cardiaque, la pression artérielle et le taux de glucose dans le sang.

2. Les récepteurs adrénergiques et leurs mutations

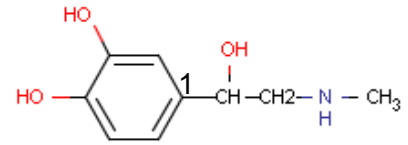
Les catécholamines agissent en se liant aux récepteurs adrénergiques. Les récepteurs adrénergiques se répartissent en deux types : les récepteurs α -adrénergiques ($\alpha_{1A,B,D}$ et $\alpha_{2A/D,B,C}$) et les récepteurs β -adrénergiques (β_1 , β_2 , β_3). Ils appartiennent tous à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

A

dopamine



noradrénaline



adrénaline

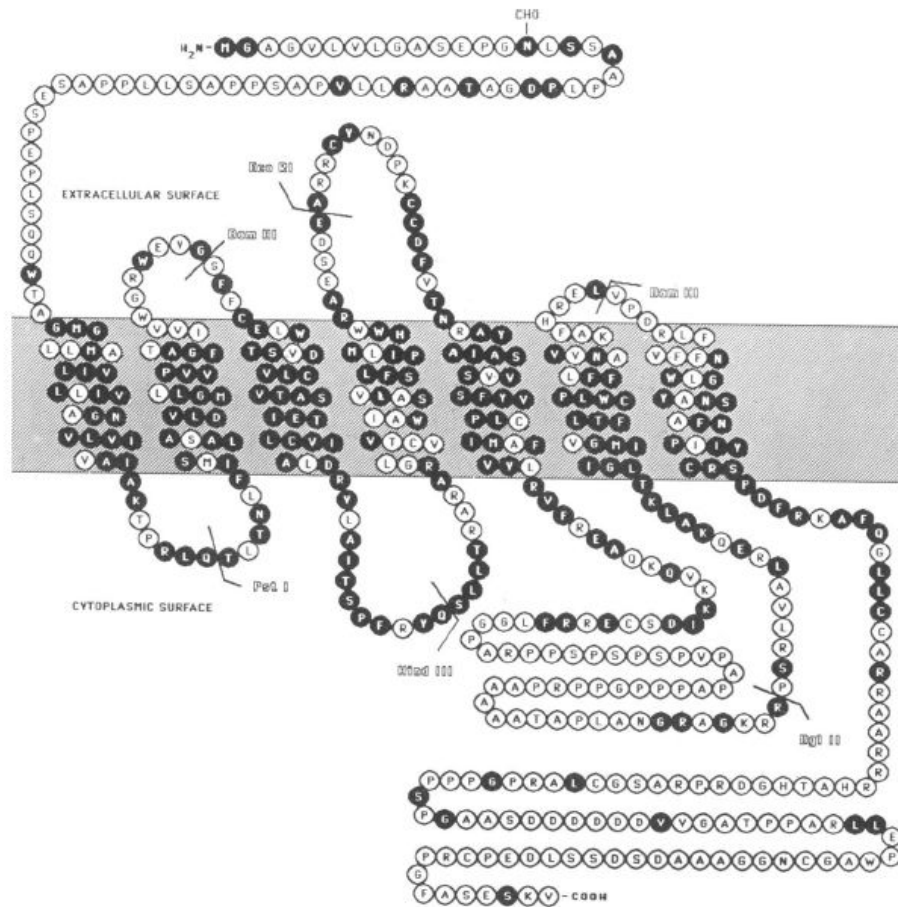
B

Figure 11: Structure des catécholamines et du récepteur β 1-adrénergique. A) La structure des catécholamines est basée sur un noyau catéchol portant en position 1 une chaîne latérale éthylamine (dopamine) ou substitué par un groupement méthyle (adrénaline). La noradrénaline possède en plus un groupement hydroxyle sur le carbone β de la chaîne latérale. B) Modèle topographique du récepteur β -1'adrénergique. Les sept domaines hydrophobiques sont représentés par les hélices α transmembranaires. Les cercles noirs avec une lettre blanche indiquent les résidus qui sont identiques à ceux du récepteur β -2 adrénergique (d'après Frielle, 1988).

a. Les récepteurs alpha-adrénergiques

Concernant le type $\alpha 1$ adrénergique, brièvement, ce récepteur est couplé à la protéine Gq/ $_{11}$ et son activation stimule la contractilité du cœur (Terzic et coll., 1993). En effet, lorsque Gq est activée, elle s'associe puis active la PLC β (Table 1). La PLC β hydrolyse principalement le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP $_2$), ce qui génère des seconds messagers intracellulaires : l'inositol (1,4,5)-triphosphate (IP $_3$) et le 1,2-diacylglycerol (DAG) (Berridge, 1987). L'IP $_3$ est un régulateur du Ca $^{2+}$ intracellulaire alors que le DAG active certaines isoformes de la PKC (protéine kinase C) conduisant à l'activation de récepteurs canaux, les canaux Trp pour «transient receptor potential ». Ils répondent aussi à l'étirement, et ils permettent une augmentation du Ca $^{2+}$ intracellulaire (Estacion et coll., 2004). Cependant, dans les cardiomyocytes ventriculaires, le signal généré par l'IP $_3$ n'est pas prédominant (Marks, 2000). A l'inverse, le DAG contribue à la signalisation $\alpha 1$ -adrénergique par l'activation des isoformes de la PKC. Ainsi, la PKC δ est généralement associée à des réponses pro-apoptotiques (Murriel et coll., 2004) alors que la PKC ϵ améliore les réponses fonctionnelles ainsi que la survie des cardiomyocytes (Heidkamp et coll., 2001).

Au niveau transcriptionnel, la voie calcique, par l'intermédiaire de la calcineurine, active le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cell) et il a été décrit que le couplage calcineurine/NFAT participe à l'hypertrophie cardiaque pathologique (Wilkins et coll., 2004). Lors d'une stimulation par un agoniste α -adrénergique, la phényléphrine (PE), la calcineurine active la voie anti-apoptotique dans le cardiomyocyte et l'activité NFAT est un composant crucial de cette voie anti-apoptotique (Pu et coll., 2003).

Les facteurs de transcription de la famille AP-1 (activator protein 1) et en particulier c-Fos, sont impliqués dans l'induction de l'hypertrophie des cardiomyocytes en réponse à la PE (Thorburn et coll., 1995). De plus, une étude récente a montré une régulation positive du promoteur de la connexine43 par l'activation de c-Fos induite par la PE (Salameh et coll., 2008). La connexine43 étant augmentée chez les patients ayant une hypertrophie ventriculaire gauche (Kostin et coll., 2004). Un rôle important des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques dans le maintien de la contractilité cardiaque au cours de l'ischémie et de l'hypertrophie pathologique est suggéré par des études cliniques et des études faites sur des souris transgéniques pour les récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques. Ces pathologies étant de plus associées à une diminution de la fonction des récepteurs $\beta 1$ -adrénergiques (Woodcock et coll., 2008).

Les récepteurs α_2 -adrénergiques sont couplés à $G_{i/o}$ (Limbird, 1988) et leurs effets cellulaires impliquent l'inhibition de l'AC. Ils seraient impliqués dans l'inhibition pré-synaptique de la libération de noradrénaline (Rump et coll., 1995). Peu de données existent actuellement sur les voies de signalisation induites par les récepteurs α_2 -adrénergiques dans les cardiomyocytes. Cependant, les patients souffrant d'une insuffisance cardiaque et qui portent un polymorphisme de perte de fonction du gène α_2cAR ont un mauvais pronostic. De plus, les porteurs de la délétion des aa 322-325 du récepteur α_2c -adrénergique ont un risque d'insuffisance cardiaque et ce risque est augmenté en présence de la mutation hyperfonctionnelle arginine 389 du récepteur β_1 -adrénergique (Small et coll., 2002).

b. Les récepteurs beta-adrénergiques

Les catécholamines ont des propriétés agonistes pour tous les récepteurs β -adrénergiques mais avec des affinités différentes. Ainsi, le profil d'affinité pour le récepteur β_1 -adrénergique est : Isoprénaline (ISO) > noradrénaline > adrénaline. Tandis que pour le récepteur β_2 -adrénergique, le profil d'affinité est différent : ISO > adrénaline > noradrénaline. Pharmacologiquement, il est donc classique d'utiliser l'ISO comme agoniste sélectif synthétique pour activer les récepteurs β -adrénergiques lors d'études expérimentales (Hoffmann et coll., 2004; Rousseau et coll., 1996).

Dans le cœur, les récepteurs β_1 -adrénergiques, dont la structure est présente figure 11.B (Frielle et coll., 1988), sont prédominants. En effet, dans les ventricules humains, les récepteurs β_1 -adrénergiques représentent 70 à 80% des récepteurs β -adrénergiques globaux et les récepteurs β_2 -adrénergiques, les 20 à 30% restants. Dans les cardiomyocytes de rat, la proportion des récepteurs β_2 -adrénergiques est plus importante (30 à 40%) que dans le cœur humain. En revanche, chez le rat, comme chez la souris, la présence des récepteurs β_3 -adrénergiques n'a pas été détectée dans les cœurs normaux (Rozec et Gauthier, 2006). La stimulation des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques provoque une augmentation du courant calcique de type L (figure 10), de la transitoire calcique et donc de l'amplitude de contraction (effet inotrope positif).

La régulation aiguë, ainsi que la régulation à long terme de la fonction myocardique, qui inclut la fréquence cardiaque, la fonction diastolique et systolique et le métabolisme, sont principalement gouvernés par les voies de signalisation activées par les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques.

Il existe une régulation différenciée du couplage excitation-contraction par les différents sous-types de récepteurs β -adrénergiques qui pourrait s'expliquer par une compartimentation différente du signal AMPc et qui serait due à une différence d'expression des différentes PDE (Fischmeister et coll., 2006). Une différence de localisation des différents sous-types de récepteurs pourrait aussi expliquer la régulation du couplage contraction-excitation. Par exemple, les récepteurs β 2-adrénergiques, mais pas les récepteurs β 1-adrénergiques, sont concentrés dans des cavéoles (Xiao et coll., 2006).

Au niveau de leurs régulations, il est bien connu que les récepteurs β 1- et β 2-adrénergiques sont soumis à une forte désensibilisation lors de leur stimulation par un agoniste en raison de la présence de sites de phosphorylation par la PKA et par la kinase des récepteurs β -adrénergiques (β -ARK) au niveau de leur extrémité N-terminale (Lohse et coll., 1996; Wallukat, 2002).

Le génotypage de diverses populations humaines a révélé que les gènes respectifs des récepteurs β -adrénergiques sont polymorphiques. Ce polymorphisme conduit au plan fonctionnel à des changements d'expression et des modifications du couplage des voies de signalisation qui entraînent une perte ou un gain de fonction et altère la désensibilisation du récepteur (Schako et coll., 2007).

3. Les voies de signalisation β -adrénergiques dépendantes de l'AMPc

Sous l'effet des récepteurs β -adrénergiques, les protéines Gs sont activées ce qui entraîne la synthèse d'AMPc par les AC (figure 10). Les formes cardiaques dominantes sont les AC de type 5 et 6 (Ishikawa et Hoc, 1997). Après production d'AMPc, la PKA est activée et va phosphoryler des substrats impliqués ou non dans la fonction du cardiomyocyte (Chu et coll., 2004). La PKA conduit aussi à l'activation des facteurs de transcription de la famille CREB, en partie responsable des effets de la stimulation chronique de cette voie.

L'AMPc peut également agir sur le cœur par une liaison directe sur des protéines telles que le facteur d'échange Epac (Morel et coll., 2005) et sur les canaux ioniques HCN de type « pacemaker » dans les cellules atriales (Di Francesco et Tortora, 1991).

Au plan fonctionnel, une augmentation aiguë de l'AMPc se traduit généralement par des effets chronotrope (fréquence cardiaque), dromotrope (conduction de l'influx nerveux), inotrope (force de contraction) et lusitrope (relaxation) positifs.

Dans les cardiomyocytes, la voie de l'AMPc est finement régulée et la dégradation de l'AMPc est reliée à une compartimentation de ce second messager. Les PDE3 et PDE4 ont été identifiées comme les acteurs responsables d'une compartimentation dynamique de l'AMPc (Fischmeister et coll., 2006; Rochais et coll., 2006). D'autres protéines comme les AKAP sont impliquées dans la compartimentation de l'AMPc. Ces AKAP lient la sous-unité régulatrice RII de la PKA, comme l'AMPc, mais aussi des PDE (Dodge-Kafka et coll., 2006) ou les phosphatases 1 et 2A (McConnachie et coll., 2006). Ainsi, lorsque la concentration d'AMPc augmente au voisinage d'une AKAP, sa liaison à RII libère la sous-unité catalytique de la PKA qui peut ainsi phosphoryler rapidement et localement le substrat lié à l'AKAP.

4. Les voies de signalisation β -adrénergiques non-dépendantes de l'AMPc

Dans les cardiomyocytes humains et de rats, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques active les protéines Gi. La phosphorylation des récepteurs β -adrénergiques par la PKA est nécessaire pour le couplage des récepteurs β -adrénergiques aux protéines Gi, suggérant que ce couplage à ce type de protéines G se produit lors d'une stimulation prolongée par un agoniste (Daaka et coll., 1997). Ainsi, le récepteur β -adrénergique couplé à Gi active la voie de la PI3K qui en retour, va inhiber la phosphorylation de protéines dépendantes de la voie AMPc-PKA. Au niveau fonctionnel, cette inhibition provoque des effets inotropes et lusitropes négatifs (Jo et coll., 2002).

Des expériences, réalisées *in vitro* dans des cardiomyocytes de rats adultes, ont montré que la stimulation soutenue des récepteurs β -adrénergiques augmente la contractilité des cardiomyocytes et l'amplitude des transitoires calciques *via* un mécanisme indépendant de la voie AMPc-PKA mais impliquant la calmoduline kinase II (CaMK II) (Wang et coll., 2004). Ainsi, la stimulation prolongée du récepteur β -adrénergique conduit à un changement de la voie de signalisation. Celle-ci passant de la voie PKA à celle de la CaMK II. Cette commutation suggère un rôle pro-apoptotique lors de stimulations β -adrénergiques soutenues (Zhu et coll., 2003).

5. Régulation β -adrénergique de la transcription

La régulation des gènes en réponse à une stimulation β -adrénergique a été étudiée principalement dans le modèle de cardiomyocytes de rats nouveau-nés en culture.

Sous l'effet de la norépinephrine, la régulation du promoteur de l'alpha-actine squelettique, une protéine du cytosquelette localisée dans les disques Z et qui participe à l'accrochage des filaments myofibrillaires d'actine, implique l'activation des récepteurs β -adrénergiques, et les facteurs de transcription de type SP-1 (« specificity protein 1 ») et NF-1 (« nuclear factor 1 ») (Bishopric et Kedes, 1991).

Une stimulation β -adrénergique ou par la FSK régule positivement l'expression de l'ARNm du facteur de transcription UBF (upstream binding factor) qui est impliqué dans la régulation du promoteur du gène précurseur des ARN ribosomiaux (Hannan et coll., 1995). L'activation du promoteur de l'ANF (Atrial Natriuretic Factor) en réponse à l'ISO dépend de l'activité de liaison à l'ADN de nombreux facteurs de transcription tels que SRF, AP-1, SP1, Nuclear Factor Y (NFY), YinYang1 (YY1) ou encore NFAT (Edwards, 2006).

Une stimulation soutenue des récepteurs β 1-adrénergiques, entraîne également une diminution de l'expression du gène de la superoxide dismutase (SOD) contribuant à augmenter le stress oxydatif et l'apoptose (Srivastava et coll., 2007). Ce mécanisme implique au niveau transcriptionnel la surexpression du facteur transcription YY1 et la diminution de l'expression du facteur de transcription Elk-1 (Ets-like gene) qui, respectivement, réprime et stimule la transcription de la SOD (Srivastava et coll., 2007).

Au niveau de la fonction du cardiomyocyte, il a été décrit que l'expression de l'ARNm de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est stimulée par l'ISO et que cette régulation implique la voie AMPc/PKA (Golden et coll., 2000).

L'activation par les récepteurs β -adrénergiques des facteurs de transcription de la famille AP-1 et des facteurs de transcription liant l'élément de réponse CRE conduit à la formation et à la sécrétion de l'IL-6 dans des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés, dans des souris transgéniques sur-exprimant le récepteur β 1-adrénergique et dans des tissus cardiaques provenant de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Rohrbach et coll., 2007). Il a aussi été décrit que la stimulation β -adrénergique active indirectement un facteur de transcription, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) qui semble jouer un rôle important dans le remodelage cardiaque. Dans les fibroblastes cardiaques de souris

nouveau-nés, l'activation de STAT3 par l'ISO résulte d'une augmentation de la libération de l'IL-6 qui pourrait, en retour, activer STAT3 dans les cardiomyocytes de souriceaux nouveau-nés (Yin et coll., 2003). Ainsi, une production intracardiaque d'IL-6 stimulée par les récepteurs β -adrénergiques pourrait agir de manière autocrine et paracrine sur le cardiomyocyte.

I. L'AMPC dans la pathologie cardiaque

Bien qu'une stimulation aiguë de la voie de l'AMPC présente des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque, une activation soutenue produit des effets délétères sur le myocarde en induisant une hypertrophie, une dysfonction ventriculaire gauche et, au final, une insuffisance cardiaque. Ceci a été montré en utilisant des modèles de souris transgéniques qui sur-expriment la sous-unité catalytique de la PKA (Antos et coll., 2001) ou qui sur-expriment la protéines G_s (Iwase et coll., 1997). Une autre étude *in vitro* réalisée sur des cardiomyocytes de rats nouveau-nés indiquent que l'effet hypertrophique est dépendant des récepteurs β_1 -adrénergiques (Morisco et coll., 2001).

L'hypertrophie cardiaque représente un mécanisme d'adaptation du myocarde en réponse à des variations de la post-charge (hypertension artérielle, sténose aortique), de la pré-charge (insuffisance mitrale ou aortique) ou au cours du remodelage pariétal qui survient dans l'évolution d'une cardiopathie ischémique. Cependant l'hypertrophie cardiaque est un facteur de risque de mortalité et de morbidité cardiovasculaire important (Benjamin et Levy, 1999). Sur le plan anatomique, l'hypertrophie cardiaque est définie par une augmentation de la masse totale du cœur, relative à la surface corporelle. Au niveau cellulaire, elle est caractérisée par une augmentation de la taille des cardiomyocytes. Des changements phénotypiques distincts dans la morphologie du myocytes apparaissent en réponse à divers stimuli de croissance. L'expression de gènes embryonnaires tels que les peptides natriurétiques est augmentée à la fois dans l'hypertrophie concentrique et dans l'hypertrophie excentrique, mais pas dans la réponse à l'exercice qui entraîne l'hypertrophie physiologique (figure 12). La désorganisation sarcomérique est typique des cardiomyopathies hypertrophiques et elle est accompagnée d'une augmentation plus étendue de la surface des cardiomyocytes. L'apoptose favoriserait le passage de l'hypertrophie compensatoire vers un phénotype d'insuffisance cardiaque (Hunter et Chien, 1999) (figure 12).

Les cellules endothéliales des vaisseaux coronariens et les fibroblastes interstitiels augmentent aussi en taille et prolifèrent, ce qui a pour conséquence une production excessive

de matrice extracellulaire et de collagène, entraînant des liaisons irréversibles de fibrose myocardique (Weber et coll., 1989).

Au cours de l'hypertrophie cardiaque pathologique, il y a une réactivation du programme des gènes fœtaux (Chien et coll., 1993) tels que l'ANF ou le BNP (Brain Natriuretic Peptide). Des facteurs de transcription définis sont impliqués dans ce processus, tels que GATA4 qui lie des séquences nucléotidiques de type GATA, MEF2 (« myocyte-specific enhancer factor 2 ») et des gènes précoces (c-Jun, c-Fos) (Akazawa et Komuro, 2003; Saadane et coll., 1999).

Un facteur de transcription dépourvu de domaine de transactivation nommé ICER pour « inductible cAMP early repressor » est induit par l'ISO dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Tomita et coll., 2003). Ce dominant négatif de la transcription est impliqué dans le rétrocontrôle de l'hypertrophie induit par l'ISO et stimule aussi l'apoptose (processus présent dans le cœur insuffisant) en combinaison (Ding et coll., 2005) ou non (Tomita et coll., 2003) avec l'angiotensine II.

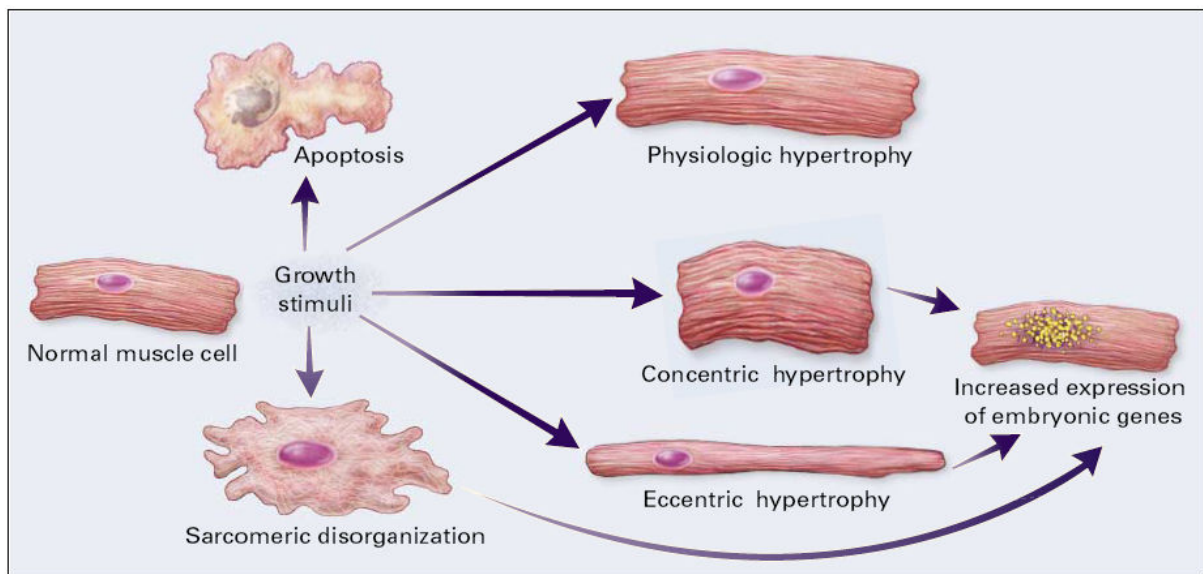


Figure 12: Morphologie des cardiomyocytes dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. (d'après Hunter et Chien, 1999).

II. L'INTERLEUKINE 1

A. Structure et maturation

La famille IL-1 comprend 11 membres dénommés IL-1F1 à IL-1F11 (F pour « family ») selon la nouvelle nomenclature (Dinarello, 2009). Nous nous intéressons ici aux 3 principaux membres : IL-1F1 (IL-1 α), IL-1F2 (IL-1 β) et IL-1F3 (IL-1Ra).

Ces trois membres se répartissent en deux agonistes (IL-1 α et IL-1 β) et un antagoniste (IL-1Ra). L'organisation des gènes de ces 3 membres de la famille IL-1 suggère une duplication d'un gène commun, il y a 350 millions d'années. Le clonage de l'IL-1 montrent deux gènes qui codent pour deux différents types d'IL-1 : l'IL-1 α et l'IL-1 β chez l'Homme (March et coll., 1985), chez la souris (Lomedico et coll., 1984) et chez le rat (Nishida et coll., 1989). L'IL-1 α et l'IL-1 β présentent des homologies de séquences en aa et en acides nucléiques qui sont respectivement de 26 et 45% chez l'Homme (March et coll., 1985). L'IL-1 α et l'IL-1 β sont synthétisées sous forme de précurseurs de 31 kDa sans peptide signal. La maturation de l'IL-1 α et de l'IL-1 β nécessite des protéases cellulaires spécifiques.

1. Maturation de l'IL-1 β

L'ARNm codant pour le proIL-1 β est traduit dans le cytosol et associé aux microtubules. Le proIL-1 β reste dans le cytosol où il peut être myristoylé afin de faciliter sa localisation à la membrane. La maturation de l'IL-1 β nécessite un hétérodimère enzymatique actif d'ICE (interleukin 1 converting enzyme). Deux hétérodimères d'ICE forment un tétramère en association avec deux molécules de proIL-1 β , ce qui permet le clivage de IL-1 β sous une forme mature de 17 kDa. IL-1 β est sécrétée alors que la partie N-terminale clivée (16kDa) peut se trouver à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule.

2. Maturation de l'IL-1 α

L'ARNm codant pour le proIL-1 α est traduit en association avec les microtubules dans le cytosol où il est myristoylé. Le proIL-1 α transloque dans la membrane cellulaire où il peut être ancré. Puis, il est clivé en une forme mature par la calpaïne, une cystéine protéase. Après le clivage, la forme mature, de 17kDa, est libérée dans le milieu extracellulaire.

3. Maturation de l'IL-1Ra

L'ARNm du IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) est transcrit dans le réticulum endoplasmique puis il est transporté dans le Golgi. Après le clivage du peptide signal, le sIL-1Ra est rapidement sécrété.

Comme il est admis que l'IL-1 α et l'IL-1 β ont des effets biologiques similaires (Gerard et coll., 2004), car ils peuvent lier et activer le même récepteur (Dower et coll., 1986), nous avons utilisé dans ce travail l'IL-1 β que nous avons appelé IL-1 dans ce manuscrit.

B. Production

Par son rôle immunologique et inflammatoire, il a tout d'abord été décrit que l'IL-1 peut être sécrétée par de nombreuses cellules du système immunitaire comme les macrophages, les lymphocytes B et T et les cellules dendritiques. Par la suite, de nombreuses études ont montré que l'IL-1 était produite par une large variété de tissus et de cellules comme les fibroblastes ou les cellules endothéliales. La production d'IL-1 dans de nombreuses pathologies a aussi fait l'objet de nombreuses études. En général, les études montrent une augmentation de l'expression du gène ou de la synthèse, qui sont déterminés par le taux d'ARNm, le marquage spécifique de tissus ou encore la production *in vivo* par des cellules en culture (Dinarello, 1996).

À l'exception des kératinocytes, de certaines cellules épithéliales et de certaines cellules du système nerveux central, l'ARNm de l'IL-1 n'est pas observé dans la plupart des types cellulaires en condition basale. Cependant en réponse à un stress (infection, inflammation), il y a une induction de la production de l'IL-1 par de nombreux types cellulaires (Dinarello, 1991).

Dans la thyroïde, les études montrent que l'expression de l'IL-1 est fortement augmentée chez les patients atteints de la maladie de Basedow (Miyazaki et coll., 1989) et l'ARNm de l'IL-1 est détecté dans les lymphocytes intra-thyroïdiens (Watson et coll., 1994). L'infiltrat lymphocytaire est la source majeure de la production locale d'IL-1 dans la thyroïde (Kawabe et coll., 1989) même si des études indiquent que les thyrocytes peuvent produire *in vitro* de l'IL-1 (Aust et Scherbaum, 1996).

Dans le cœur, de nombreuses études indiquent une l'expression élevée de l'IL-1 chez des patients atteints de diverses pathologies cardiaques (Long, 2001). La source de production d'IL-1 a été étudiée et il est suggéré que la production intracardiaque de l'IL-1 est attribuée à une population de cellules non-musculaires (Long, 2001) telle que l'infiltrat lymphocytaire (Ono et coll., 1998) mais aussi les fibroblastes cardiaques (Yue et coll., 1998).

C. Le complexe récepteur de l'IL-1

Le récepteur de l'IL-1 consiste en deux chaînes polypeptidiques comprenant des domaines extracellulaires, composés de trois domaines IgG (Immunoglobuline G) « like », des domaines transmembranaires et dans le cas du récepteur à l'IL-1 de type 1, un domaine intracellulaire induisant le signal (Martin et Wesche, 2002) (figure 13).

Il existe deux récepteurs à l'IL-1 (IL-1R), issu de deux gènes distincts : le type I (IL-1RI) qui est couplé à des voies de signalisation et le type II (IL-1RII) qui lie l'IL-1 mais n'induit pas de signal intracellulaire, c'est un récepteur leurre. Le gène de l'IL-1RI a été cloné en 1988 (Sims et coll., 1988) et le gène de l'IL-1RII a été cloné en 1991 (McMahan et coll., 1991). La portion extracellulaire du IL-1RII est homologue à celle de l'IL-1RI mais son extrémité C-terminale est plus courte et ne permet pas de transmettre de signal (Stylianou et coll., 1992) (figure 13).

1. Le récepteur de type I

L'ARNm du IL-1RI code pour un polypeptide de 567 aa avec une partie cytoplasmique de 213 aa (Sims et coll., 1994). Le domaine cytosolique du IL-1RI a 45% d'homologie en aa avec celui exprimé par le gène Toll chez la Drosophile. L'organisation des gènes et l'homologie en aa suggèrent que le IL-1RI et les récepteurs Toll sont dérivés d'un ancêtre commun. Ceux-ci sont d'ailleurs regroupés au sein d'une famille « Toll-like Receptor » (O'Neill et Greene, 1998). Le récepteur de l'IL-1 est une glycoprotéine de 80 kDa qui a été décrite en 1985, et dont les sites de glycosylation favorisent la liaison de l'IL-1 à son récepteur (Dower et coll., 1985).

L'expression du IL-1RI a été mise en évidence dans de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales, les hépatocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules dendritiques épidermiques et les

lymphocytes T (Deyerle et coll., 1992; Dinarello, 1996). Ainsi, l'expression du récepteur de l'IL-1 dans les tissus non-lymphoïdes suggère un rôle régulateur physiologique de l'IL-1.

Dans les lignées cellulaires, le nombre de IL-1RI peut aller jusqu'à 5000 par cellule. Par contre, les cellules en culture primaire expriment moins de 200 récepteurs (Dinarello, 1996). Toutefois, l'expression de surface des récepteurs est corrélée avec la capacité des cellules à répondre à l'IL-1. En effet, l'activité biologique de l'IL-1 est un meilleur moyen de mesure que la liaison du ligand à la surface cellulaire. De plus, les cellules peuvent exprimer des taux forts et stables d'ARNm de l'IL-1RI mais de faibles niveaux protéiques. L'expression de surface du IL-1RI est augmentée par les esters de phorbol, la PGE₂, la dexaméthasone, l'IL-2 ou encore l'IL-4. Dans une lignée de fibroblastes de poumon, l'IL-1 peut réguler positivement l'expression de son récepteur en augmentant la synthèse de la PGE₂ (Takii et coll., 1992). Par contre, l'IL-1 entraîne une baisse de l'expression de surface du récepteur IL-1RI dans des lymphocytes et cette diminution correspond à une baisse de la demi-vie de l'ARNm (Ye et coll., 1992).

2. La protéine accessoire : IL-1R-AcP

Pour que le signal dépendant de l'IL-1 soit transmis, le IL-1RI doit se complexer avec la IL-1R-AcP (IL-1 Receptor Accessory Protein) (Greenfeder et coll., 1995). Bien que les domaines extracellulaires et cytoplasmiques de l'IL-1R-AcP aient des homologies avec ceux de l'IL-1RI (figure 13), seule, la IL-1R-AcP permet la médiation du signal vers le cytoplasme en recrutant l'Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) (Huang et coll., 1997).

Il existe une homologie de séquence entre les domaines cytoplasmiques de l'IL-1RI, de l'IL-1R-AcP et celui de la gp130 (glycoprotéine permettant la signalisation de l'IL-6). La délétion des domaines similaires à la gp130 portés par le domaine cytoplasmique IL-1RI résulte d'une réponse diminuée à l'IL-1. Ainsi, il n'est pas étonnant de trouver des propriétés biologiques communes entre l'IL-1 et l'IL-6 comme par exemple l'induction de la fièvre, l'activation des cellules souches hématopoïétiques et la stimulation de l'axe adrénérergique hypothalamo-hypophysaire (Dinarello, 1996).

3. Le récepteur de type II

Le IL-1RII, protéine de 398 aa, possède un poids moléculaire de l'ordre de 60-65 kDa (Slack et coll., 1993). Ce récepteur ne forme pas de complexe avec IL-1RI et ne permet pas la transduction du signal du fait de la quasi-absence du domaine cytosolique, ce qui le rend fonctionnellement inactif (figure 13). Chez l'Homme et la souris, l'IL-1RII possède un domaine cytosolique court qui consiste en 29 aa alors que chez le rat, il y a 6 aa chargés en plus. Ce type de récepteur joue un rôle de leurre pour l'IL-1 car celui-ci se lie de manière forte à ce récepteur aux dépens de sa liaison avec IL-1RI.

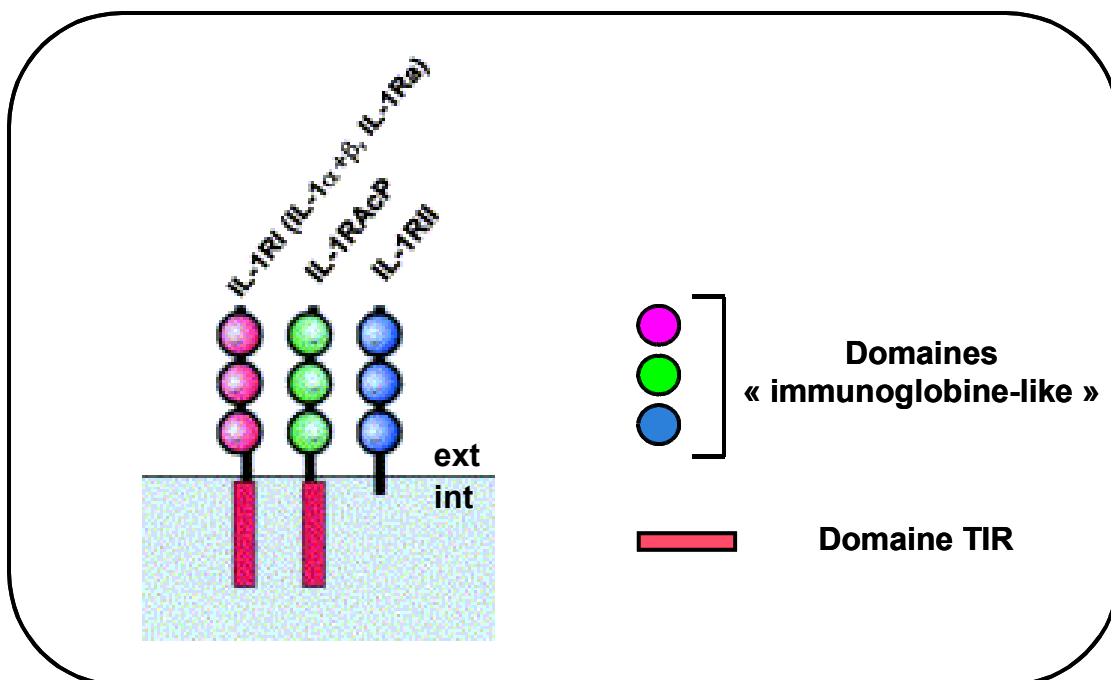


Figure 13: Représentation schématique des récepteurs de l'IL-1.
 int.: compartiment sous-membranaire; ext.: milieu extracellulaire.
 (Adaptation de Martin and Wesche, 2002).

4. Activation du complexe-récepteur de l'IL-1

La figure 14 présente le signal induit par l'IL-1 après l'activation du IL-R. l'IL-1 se lie au IL-1RI mais avec une faible affinité ce qui induit un changement structural du IL-1RI permettant la liaison de l'IL-1R-AcP au complexe IL-1-RI/IL-1 (étape 1). Ce complexe formé permet le recrutement de MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), une protéine adaptatrice, via une interaction homophile, avec son domaine TIR (TLR (Toll-like receptor)-and IL-1 related) (étape 2). Il y a ensuite, interaction via leurs domaines de mort DD (« death domain ») entre MyD88 et IRAK-4 qui fait partie du complexe préformé IRAK-1/Tollip (« Toll interacting protein »). IRAK-4 phosphoryle IRAK-1 et l'active ce qui entraîne le recrutement de TRAF-6 (TNF (tumor necrosis factor)- receptor-associated factor 6) (étape 3).

Phospho-IRAK-1 et TRAF-6 se dissocient du complexe récepteur (étape 4) et vont interagir à la membrane avec le complexe TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) /TAB1 (TAK-1 binding protein 1) /TAB2, ce qui conduit à la phosphorylation de TAK1 et TAB2 (étape 5).

IRAK-1 reste à la membrane où il est dégradé alors que le complexe TRAF-6/TAK1/TAB1/TAB2 migre dans le cytosol (étape 6) et s'associe avec des ubiquitines ligases (Ubc13 et Uev1A). TRAF-6 est ubiquitynilé ce qui permet l'activation de TAK1 (étape 7).

TAK1 phosphoryle le complexe IKK (I κ B kinase) (étape 8) mais aussi les MKK (MAPK Kinase) (étape 9), ce qui conduit, respectivement, à l'activation des voies NF- κ B (nuclear factor- κ B), des JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et des p38-MAPKs (Dinarello, 2009).

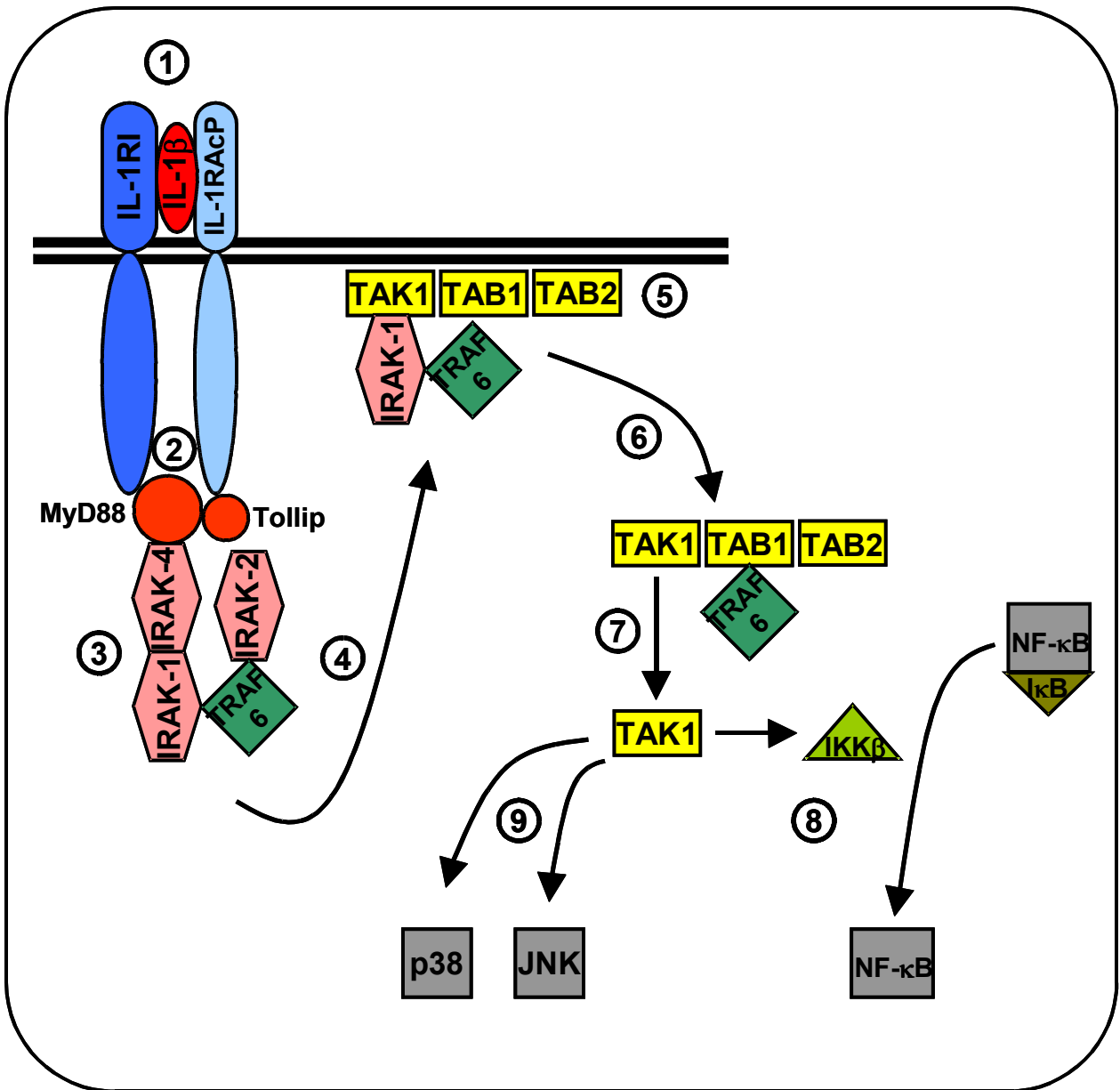


Figure 14: Voies de signalisation de l'IL-1β. (Adaptation de Dinarello, 2009).

5. Les voies de signalisation induites par l'IL-1

a. la voie NF- κ B.

Dans la plupart des cellules, à l'état latent, le facteur de transcription NF- κ B est sous forme d'un complexe inactif avec l'inhibiteur I κ B (inhibitor- κ B) qui le séquestre dans le cytoplasme. Après activation à la membrane, de récepteurs spécifiques, la sérine-kinase, IKK, est activée. L'activation de la kinase IKK mène à la phosphorylation de deux sérines spécifiques au niveau du segment N-terminal de I κ B α . Une fois phosphorylé, I κ B α est étiquetée par ubiquitinylation et elle est dégradée par le protéasome. NF- κ B est démasqué et peut, par la suite, entrer dans le noyau et activer l'expression de gènes-cibles (Karin, 1999, 2008).

b. La voie des JNK

Trois gènes codent pour les JNK : JNK1, JNK2 et JNK3. Les protéines ont plus de 85% d'homologie, et il existe au moins dix variants d'épissage dont le poids moléculaire varie entre 46 et 55 kDa (Kyriakis et Avruch, 2001). JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires alors que l'expression de JNK3 est restreinte au cerveau. Les JNK sont activées en réponse aux cytokines inflammatoires, aux stress environnementaux (chocs thermiques, radiations ionisantes, stress oxydatifs, altération de l'ADN) et aux facteurs de croissance. Elles sont activées par phosphorylation sur thréonine 183 et tyrosine 185 par MKK4/MKK7 dans le motif thréonine-proline-tyrosine. Les MKK sont elles-mêmes activées par phosphorylation par les MKKK (MKK kinases) (Kyriakis et Avruch, 2001).

Les JNK phosphorylent les facteurs de transcription c-Jun, ATF-2 (activating transcription factor 2), Elk-1 (ETS-like gene-1) / Sap-1, et NFAT qui interagissent avec les MAPK au niveau du motif CD (« common domain »). Ces facteurs de transcription activent à leur tour des gènes-cibles qui régulent la prolifération, la différenciation cellulaire ou l'apoptose. JNK1 est majoritairement la kinase qui phosphoryle c-Jun après une stimulation.

Les JNK sont impliquées, entre autres, dans la production de cytokines et dans la réponse inflammatoire. En effet, il a été montré que les JNK sont impliquées dans l'induction de l'IL-6 par l'IL-1 dans une lignée cellulaire de carcinome épidermique humain (Krause et coll., 1998) ou plus récemment dans les cellules épithéliales tubulaires de rein (de Haij et coll., 2005).

c. La voie des p38-MAPK

La famille des p38-MAPK est composée de quatre membres (α , β , γ et δ) dont l'homologie de séquence est de 40%. Seules les isoformes α et β sont exprimées de façon ubiquitaire (Raman et coll., 2007). Les p38-MAPK sont stimulées par un large éventail de signaux extracellulaires et particulièrement par le stress cellulaire tels que les radiations UV, les chocs osmotiques, l'hypoxie et les cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 (Raingeaud et coll., 1995). Les p38-MAPK sont activées en amont par phosphorylation par les MKK3 et MKK6 sur thréonine 183 et tyrosine 185 dans le motif thréonine-glycine-tyrosine (Kyriakis et Avruch, 2001). Les p38-MAPK activées phosphorylent à leur tour un certain nombre de facteurs de transcription tels que Elk-1/Sap-1, ATF-2 ou encore MEF-2C (Karin, 2005). Les facteurs de transcription C/EBP β et CHOP (C/EBP (CAAT Enhancer Binding Protein) homologous protein), sont aussi activés par les p38-MAPK (Wang et Ron, 1996).

d. La voie des céramides.

Rapidement après l'activation du récepteur de l'IL-1, il y a hydrolyse de GTP, de phosphatidylcholine, de phosphatidylsérine, de phosphatidyléthanolamine, ainsi qu'une libération de céramide par la sphingomyélinase de type neutre dans les thyrocytes de porc (Schneider et coll., 2000) ou dans les cardiomyocytes de rat adulte en culture (Schreur et Liu, 1997). La libération de céramide est l'événement précoce du signal qui conduit à l'activation, entre autres, de la PLA₂ et de certaines isoformes de la PKC (Kolesnick, 2002).

D. Facteurs de transcription et régulation de l'expression génique

L'IL-1 active donc de nombreuses voies de signalisation qui conduisent à la régulation de nombreux gènes cibles (pour revue, Dinarello, 1996). Il induit l'augmentation de l'expression des gènes de la famille IL-1 et d'une manière semblable, les gènes d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, dans de nombreux types cellulaires. De plus, il induit la transcription ou la stabilisation des messagers des gènes associés à l'inflammation. Ainsi, trois gènes codant pour des enzymes, iNOS (monoxyde d'azote (NO) synthase inductible), COX-2 (cyclo-oxygénase 2), PLA₂, répondent à l'IL-1. De nombreux oncogènes sont induits par l'IL-1 (c-Jun, c-fos, c-abl, c-fms, c-myc) mais aussi des gènes codants pour des molécules d'adhésion comme ICAM-1 (intercellular adhesive molecule).

Le facteur de transcription NF- κ B est un médiateur crucial dans la voie de signalisation de l'IL-1 et est considéré comme le médiateur intracellulaire majeur permettant l'induction des nombreux gènes-cibles régulés par l'IL-1. Les promoteurs de ces gènes-cibles possèdent l'élément de réponse pour NF- κ B au niveau de la région proximale de leur promoteur (De Bosscher et coll., 2000; Mercurio et Manning, 1999).

E. Effets biologiques

a. Dans la thyroïde

L'IL-1 induit la production de NO dans les cellules thyroïdiennes épithéliales humaines en culture (Rasmussen et coll., 1994) mais pas dans les cellules FRTL-5 (Reimers et coll., 1996). L'IL-1 stimule aussi la production de GMPc (Rasmussen et coll., 1997). L'IL-1, à des concentrations non-physiologiques, inhibe la production d'AMPc alors qu'elle l'active à des concentrations physiologiques (Krogh Rasmussen et coll., 1988).

Les effets de l'IL-1 sur les cellules thyroïdiennes ont été caractérisés *in vitro*. Par exemple, l'IL-1 a un effet sur la croissance des cellules thyroïdiennes puisque l'IL-1 augmente l'incorporation de ³H-thymidine dans des thyrocytes humains (Kawabe et coll., 1989) et dans les cellules FRTL-5 (Mine et coll., 1987).

Les effets de l'IL-1 sur la fonction cellulaire thyroïdienne ont été caractérisés dans les thyrocytes humains normaux ou pathologiques (adénomes), dans les thyrocytes de porc et dans les cellules FRTL-5. Il a été démontré que l'IL-1 inhibe l'expression des gènes de la Tg (Yamashita et coll., 1989), de la TPO (Ashizawa et coll., 1989), de la désiodase de type 1 (Pekary et coll., 1994) et du NIS (Ajjan et coll., 1998). Cependant, des doses physiologiques d'IL-1 ont tendance à augmenter la production de thyroglobuline (Krogh Rasmussen et coll., 1988). Dans les cellules FRTL-5, il a été décrit que l'IL-1 augmente la production de l'IL-6 (Diamant et coll., 1991). Ainsi, certains effets de l'IL-1 observés au niveau de la thyroïde sont donc probablement indirects et pourraient être attribués à l'IL-6.

L'apoptose est un événement majeur rencontré dans les maladies auto-immunes thyroïdiennes. De nombreuses études ont montré l'action pro-apoptotique de l'IL-1 qui stimule l'expression de Fas dans les thyrocytes normaux (Kawakami et coll., 1996), dans les thyrocytes de patients atteints de la maladie de Basedow (Kawakami et coll., 1997) et dans les thyrocytes de patients atteints de la thyroïdite d'Hashimoto (Giordano et coll., 1997). La voie pro-apoptotique TRAIL (TNF-related apoptosis-induced ligand) est augmentée par l'IL-1

dans des cultures primaires de thyrocytes normaux (Mezosi et coll., 2004). Enfin, une action pro-apoptotique de l'IL-1 dépendante des céramides a été mise en évidence dans les cellules thyroïdiennes de porc en culture (El Btaouri et coll., 2006).

Dans des thyrocytes de patients atteints de la maladie de Basedow (Weetman et coll., 1989), ainsi que dans les cellules FRTL5 (Tandon et coll., 1991), l'IL-1 induit ICAM1, un récepteur de surface facilitant l'adhésion cellulaire ciblée par l'antigène.

L'IL-1, suivant la dose utilisée, joue un double rôle en participant à la fois au dommage du tissu mais apporte aussi des effets protecteurs (Krogh Rasmussen et coll., 1988).

b. Dans le cœur

Des études *in vitro* ont montré que l'IL-1 active le promoteur humain du BNP transfecté dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (He et LaPointe, 1999; Ma et coll., 2004). Le BNP et les autres membres de la famille des peptides natriurétiques sont impliqués dans les altérations induites au niveau de la croissance des cardiomyocytes et de l'expression des gènes (Stein et Levin, 1998). L'IL-1, en combinaison avec le TNF- α et l'IFN- γ , induit l'apoptose des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Ing et coll., 1999). Dans ce type cellulaire, les taux d'ARNm de la SERCA, du phospholamban, des canaux calciques dépendants du voltage et du RyR sont diminués en réponse à l'IL-1 (McTiernan et coll., 1997; Thaik et coll., 1995). De manière cohérente avec ces changements d'expression, l'homéostasie calcique a été rapportée comme anormale dans des cardiomyocytes traités avec des cytokines (Bick et coll., 1999).

Dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'IL-1 réprime l'effet α -adrénergique des promoteurs des gènes de l'actine squelettique et de la chaîne lourde de la myosine β (Patten et coll., 1996). L'IL-1 induit l'expression de l'ARNm de la protéine iNOS et la génération de NO (Kacimi et coll., 1997). L'IL-1 régule aussi l'expression des protéines d'adhésion ICAM et VCAM par un mécanisme dépendant de l'activité de liaison à l'ADN de NF κ B et AP-1 (Kacimi et coll., 1998). Il a été aussi décrit que l'expression de c-fos est induite par l'IL-1 dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Patten et coll., 1996).

L'IL-1 par ses effets propres peut conduire à l'altération de la fonction cardiaque. Il est donc important de comprendre les mécanismes de son action sur le cœur (Long, 2001).

III. L'INTERLEUKINE 6

A. Les cytokines de la famille IL-6

Cette famille comprend l'IL-6, l'IL-11, le LIF (leukemia inhibitory factor), l'OSM (oncostatine M), le CNTF (ciliary neurotrophic factor), la CT-1 (cardiotrophin 1) et le CLC (cardiotrophin-like cytokine). Ces cytokines ont en commun une protéine glycosylée de 130 kDa (gp130) qui intervient dans la transduction du signal au niveau du complexe-récepteur activé (Heinrich et coll., 2003).

B. Structure et régulation du gène codant pour l'IL-6

Le gène humain de l'IL-6 a été cloné en 1986. Il était désigné, à l'époque, comme le bsf-2 (B cell stimulatory factor 2) pour la capacité de la protéine qui est exprimée à partir de ce gène à induire la différenciation des cellules B (Hirano et coll., 1986). Le nom de ce facteur sera rapidement renommé par le terme « interleukine 6 » afin d'éviter une nomenclature confuse (Poupart et coll., 1987).

Le gène humain de l'IL-6 est situé sur le chromosome 7 (7p21) sur une longueur d'environ 5 kb, comparé à une longueur de 7 kb pour la souris (Tanabe et coll., 1988). Le gène humain de l'IL-6 est constitué de quatre introns et de cinq exons et contient trois sites d'initiation de la transcription qui correspondent à 3 séquences TATA-like (Yasukawa et coll., 1987) (figure 15.A).

Le promoteur de l'IL-6 se comporte comme un senseur biologique sophistiqué qui répond au stress environnemental et à l'homéostasie immunologique. Il est induit par une pléthore de composés chimiques ou physiologiques qui inclut les endotoxines bactériennes, les virus (comme le HIV) ou encore les cytokines inflammatoires (IL-1 et TNF par exemple). Les mécanismes impliqués dans l'activation du promoteur de l'IL-6 ont été largement étudiés au début des années 1990 (Brach et coll., 1993; Dendorfer et coll., 1994; Gruss et coll., 1992; Janaswami et coll., 1992; Shimizu et coll., 1990; Yan et coll., 1995; Yee et coll., 1991; Zhang et coll., 1994; Zhang et coll., 1990) (table 2).

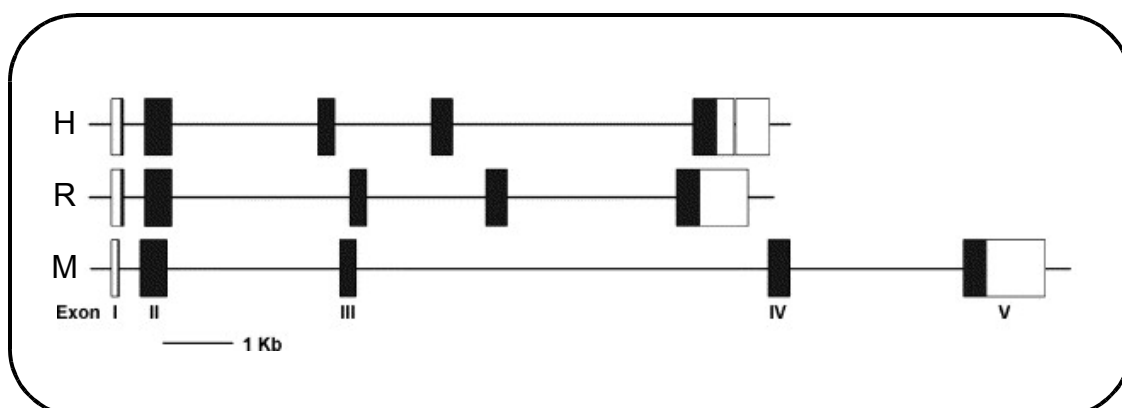
1. Description du promoteur

Bien que la taille du promoteur du gène de l'IL-6 ne soit pas encore bien définie, il a été démontré qu'un fragment de 1,2 kb de la région 5' flanquante du gène de l'IL-6 contient tous les éléments nécessaires pour sa modulation par une variété de stimuli (Ray et coll., 1988). Par la suite, les études de caractérisation du promoteur humain de l'IL-6 ont révélé une région de contrôle très conservée, d'une longueur de 300 pb en amont du site d'initiation de la transcription qui contient la plupart, si ce n'est la totalité, des éléments nécessaires pour son induction (Li et coll., 2004) (figure 15.B).

Des expériences de retards sur gel et des mutations ponctuelles ou des délétions du promoteur du gène de l'IL-6 ont permis de mettre en évidence la présence et l'implication fonctionnelle d'un élément liant le facteur de transcription NF-kB entre les positions -73 et -63, d'un élément de réponse à l'AMPc (CRE) associé à un site de liaison aux facteurs de transcription de la famille C/EBP entre -173 et -145, et d'un site liant les facteurs de transcription AP-1 localisé entre -283 et -277. Un autre site putatif C/EBP (-87 à -76) a été décrit (Vanden Berghe et coll., 1999; Vanden Berghe et coll., 1998). Le promoteur du gène de l'IL-6 possède une séquence riche en GC qui contient 3 répétitions du motifs CCACC (-108 à -93) et des études ont montré que l'activation du facteur de transcription SP-1, qui lie cette séquence riche en GC, intervient dans l'induction du promoteur de l'IL-6 par le LPS (Kang et coll., 1996) mais aussi dans l'expression basale du gène de l'IL-6 (Gerlo et coll., 2008). L'IRF-1 (interferon regulatory factor 1) peut lier une séquence localisée à -267 à -254 sur le promoteur de l'IL-6 en réponse au TNF- α (Sanceau et coll., 1995).

Par ailleurs, le promoteur du gène humain de l'IL-6 contient trois boîtes TATA qui peuvent être utilisées préférentiellement selon les différents tissus (Yasukawa et coll., 1987).

A



B

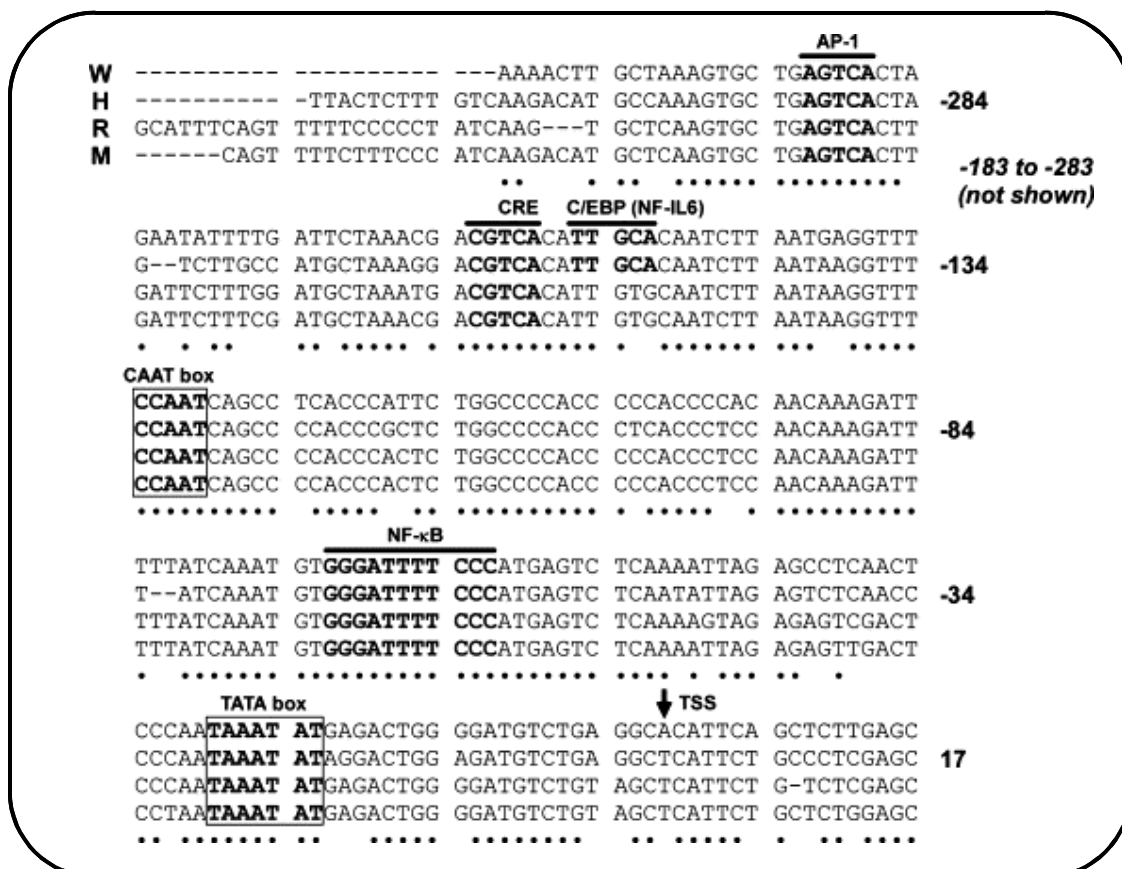


Figure 15: Structure du gène et du promoteur de l'IL-6 de Mammifères.

A) Organisation structurelle des introns et des exons. Les rectangles noirs indiquent les régions codantes et les rectangles blancs indiquent les régions non traduites. B) Région proximale du promoteur. Les sites de régulation sont notés en gras. TSS: site de départ de la transcription; H: humain; R: rat; M: souris; W: marmotte. (Extrait de Li et coll., 2004).

2. Activation du promoteur

La production d'IL-6 n'est généralement pas constitutive, mais induite de façon transitoire en réponse à une stimulation appropriée lors d'un stress. Ainsi, les premières études sur l'induction du gène de l'IL-6 mettent en évidence plusieurs voies de signalisation dont la voie AMPc/PKA, la voie DAG/PKC et la voie IP3/Ca²⁺/Calmoduline. Les activateurs respectifs de ces voies de signalisation (esters de phorbol, FSK, ionophore calcique) peuvent stimuler la synthèse de l'IL-6 (Sehgal et coll., 1987; Zhang et coll., 1988). Ces signaux activent des protéine-kinases dont le rôle est de phosphoryler des facteurs qui participent à la transcription de l'IL-6. Leur rôle consiste généralement à faciliter l'assemblage du facteur TBP (TATA binding protein) avec les autres protéines qui forment le complexe d'initiation autour d'une boîte TATA.

L'introduction de mutations dans les éléments du promoteur placé en amont d'un gène rapporteur (de type chloramphenicol acetyl-transférase ou de type luciférase) et l'analyse de leurs effets lors d'expériences en transfection transitoire ont permis d'identifier les facteurs de transcription impliqués dans la stimulation de l'activité du promoteur de l'IL-6 : NF-kB, NF-IL-6, SP1, CREB et AP-1. Le facteur de transcription NF-kB pré-existe dans les cellules sous une forme inactive. Une fois activé en réponse à de nombreux stimuli (table2), NF-kB migre dans le noyau où il s'associe au site NF-kB du promoteur de l'IL-6. NF-kB constitue un facteur essentiel dans l'activation du gène de l'IL-6 (table 2). Des travaux ont montré qu'il doit coopérer avec d'autres facteurs comme la protéine SP1 et la protéine IRF-1 pour activer la transcription du gène de l'IL-6 lors d'une stimulation par l'IFN- γ ou le TNF- α (Faggioli et coll., 1997; Sanceau et coll., 1995).

3. Répression du promoteur :

L'expression de l'IL-6 doit être finement régulée pour éviter que la protéine soit produite en quantité excessive durant un stress et pour empêcher sa synthèse dans des circonstances qui n'exigent pas sa présence. De nombreux mécanismes pour réprimer le promoteur du gène de l'IL-6 ont été caractérisés. Ainsi, la transfection transitoire de mutants du promoteur du gène de l'IL-6 a permis de confirmer le rôle de répresseur de trois protéines : le facteur RBP-Jk, le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur aux oestrogènes (Stein et Yang, 1995).

Stimulation	Type cellulaire	Facteurs de transcription	Références
LPS	monocyte	NF-IL6,NF-kB	Zhanget coll, 1994
hypoxie	cellules endothéliales	NF-kB	Yan et coll, 1995
PGE1	monocyte	AP-1, NF-IL6,NF-kB	Dendorfer et coll, 1994
LPS	monocyte	NF-kB	Dendorfer et coll, 1994
radiations ionisantes	fibroblastes	AP-1, NF-kB	Brach et coll,1993
IL-1,TNF, AMPc	HeLa, HepG2	-	Janaswami et coll, 1992
LIF	monocyte	NF-kB	Gruss et coll, 1992
IL-1,LPS, AMPc	lymphome	-	Yee et coll, 1991
IL-1, TNF	fibroblastes	NF-kB	Zhang et coll, 1990
forskoline	fibroblastes	-	Zhang et coll, 1990
IL-1, TNF	HeLa, glioblastome	NF-kB	Shimizu et coll, 1990

Table 2: Principaux activateurs de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6.

Ce tableau illustre les premiers travaux du début des années quatre-vingt dix qui ont suivi le clonage du gène de l'IL-6. Les cellules (ex: monocytes) et les médiateurs (ex: IL-1;TNF) de l'immunité constituant un matériel de choix pour l'étude de la régulation du promoteur de l'IL-6.

Dans des conditions basales, la répression du promoteur du gène de l'IL-6 est due, du moins en partie, par l'occupation du site NF-kB par le facteur RBP-Jk qui empêche NF-kB d'accéder au site NF-kB (Plaisance et coll., 1997).

C. Structure de l'ARNm et stabilité

1. Structure de l'ARNm

L'expression du gène humain ou murin de l'IL-6 conduit à l'expression respective d'ARNm d'une taille de 1,2 à 1,3 kb (Chiu et coll., 1988; Yasukawa et coll., 1987). Concernant le gène de l'IL-6 de rat, son expression conduit à deux espèces d'ARNm, l'une majoritaire de 1,2 kb et une autre, cinq fois moins abondante de 2,4 kb. Ces deux espèces sont générées par deux sites alternatifs de polyadénylation séparés par une distance de 1,2 kb (Northemann et coll., 1989).

L'homologie de séquence entre les ADNc d'IL-6 d'Homme et de rat est seulement de 68% alors que l'homologie entre celui de souris et de rat atteint 93% (Northemann et coll., 1989).

L'ARNm mature de l'IL-6 code une séquence traduite en un polypeptide de 212 aa chez l'Homme et de 211 aa pour la souris et le rat. L'homologie de la séquence de rat avec celle de souris est de 93% contre 58% avec celle de l'Homme.

2. Stabilité

Chez les vertébrés, certains ARNm ont une demi-vie courte comme les ARNm des cyclines, des cytokines, des facteurs de croissance ou encore des proto-oncogènes. Ces ARNm possèdent des séquences riches en résidus adénine (A) et uracile (U), les séquences ARE (AU-rich elements), dans leurs régions 5' UTR (untranslated region/ région non traduite), 3' UTR ou parfois dans la région codante. Deux types de ARE ont été identifiées : un type pentamère (5'-AUUUA-3') et un type nonamère (5'-UUAUUUAUU-3') (Shim et Karin, 2002). Ces séquences sont reconnues par des protéines AUBPs (ARE-binding proteins) déstabilisatrices comme la tristétrapoline ou AUF-1 (« A+U-Rich Element Binding Factor 1 »). Ces facteurs agissent en recrutant les enzymes de dégradation (désadénylases, exosome) et activent la dégradation par une accélération de la désadénylation. Dans d'autres conditions,

les séquences ARE peuvent lier des protéines stabilisatrices qui entrent en compétition avec les protéines déstabilisatrices ou pourraient inhiber directement la machinerie de dégradation.

La plupart des gènes des cytokines codent pour des transcrits, qui sont instables dans les cellules non-stimulées, mais qui peuvent être considérablement stabilisés après une stimulation cellulaire. Les p38-MAPKs contrôlent l'expression, mais aussi contrôlent les modifications post-transcriptionnelles de la tristetrapoline, un régulateur qui est impliqué dans la stabilité de l'ARNm du TNF α (Mahtani et coll., 2001). La phosphorylation de la protéine AUF1 par les p38-MAPK déstabilise sa liaison aux ARE ce qui conduit à augmenter la stabilité des ARNm (Wilson et coll., 2003). Les p38-MAPK activent la MK2 (MAPKAPK2 pour « Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 ») qui est impliquée dans les mécanismes de stabilisation des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 (Winzen et coll., 1999). En effet, dans les macrophages de souris KO (« knockout ») MK2 $-/-$, la demi-vie de l'ARNm de l'IL-6 est réduite de plus de dix fois et dans les cellules HeLa, la stabilité de l'ARNm de la β -globine qui comporte les ARE de la région 3'UTR de l'ARNm de l'IL-6 est augmentée par MK2 (Neininger et coll., 2002).

D. Structure de la protéine et production

L'IL-6 mature, après coupure du peptide signal de 28 aa, est une glycoprotéine soluble de 184 aa avec une masse moléculaire située entre 21 kDa et 28 kDa qui dépend des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation (May et coll., 1988). Il existe deux sites de N-glycosylation (résidus 45 et 144) et de nombreux sites de O-glycosylation. La forme de 26 kDa est O-glycosylée, tandis que la forme de 28 kDa est O- et N-glycosylée. La glycosylation de l'IL-6 n'a aucune influence ni sur sa sécrétion ni sur son activité.

Il existe également deux ponts disulfures dont l'un est essentiel à l'activité biologique de l'IL-6. La structure tridimensionnelle de l'IL-6 est hélicoïdale à 67 %, contient 15 % de structure β et 18 % d'angle et d'enroulement (Somers et coll., 1997) (figure 16).

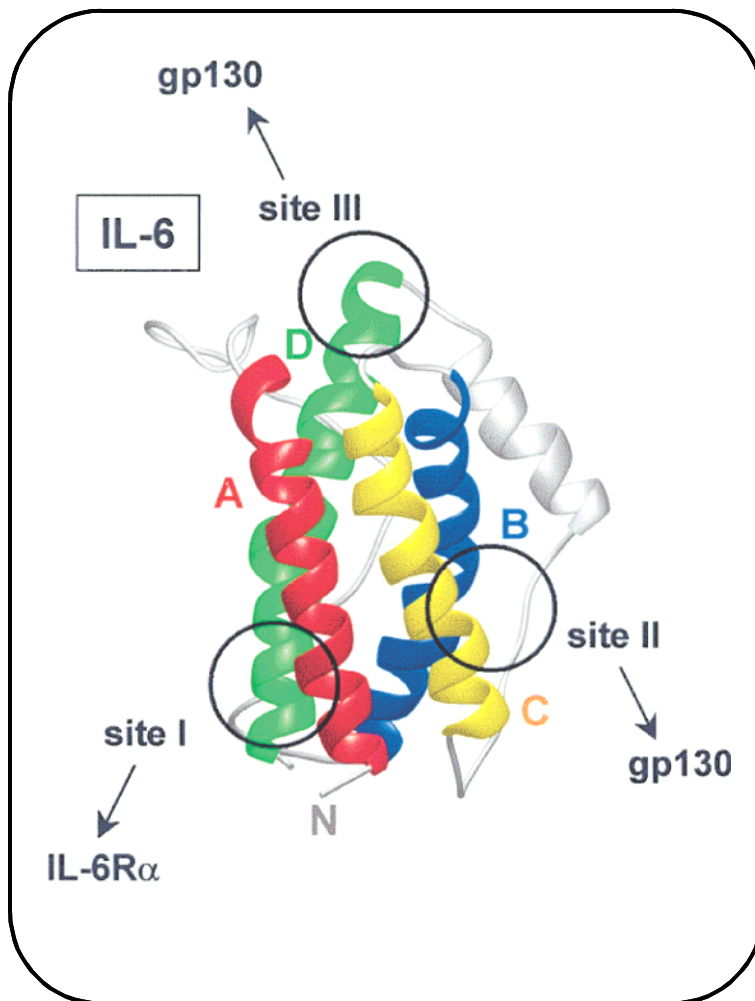


Figure16: Structure de l'IL-6. Les quatre hélices α A, B, C et D sont marquées par des couleurs différentes lesquelles sont arrangées en configuration «montante-montante-descendante-descendante ». Les sites de liaison au récepteur de l'IL-6 sont entourés d'un cercle noir. (extrait de Heinrich et coll., 2003).

1. Régulation de la production de l'IL-6 dans la thyroïde

Dans des cultures primaires de thyrocytes humains de patients atteints par la maladie de Basedow, l'expression de l'ARNm et la sécrétion de l'IL-6 sont constitutifs (Grubeck-Loebenstein et coll., 1989). Par ailleurs, une étude a mis en évidence une production d'IL-6 par des thyrocytes humains normaux (Bendtzen et coll., 1989). Dans plusieurs lignées cellulaires, établies à partir de carcinomes indifférenciés ou d'un carcinome de la thyroïde, une sécrétion d'IL-6 a été mesurée en quantité importante (Yoshida et coll., 1994). Les auteurs ont alors suggéré que la production locale de cytokines n'est pas restreinte à l'infiltrat lymphocytaire mais que les thyrocytes eux-mêmes participent à cette production. Par la suite, l'IFN- γ , le TNF- α mais aussi la TSH ont été décrits comme des inducteurs de l'IL-6 dans des thyrocytes humains en culture (Weetman et coll., 1990) (figure 17). L'expression de l'IL-6 a été détectée par immunocytochimie dans 100 % des cas de maladies de Basedow ou de thyroïdites d'Hashimoto (Ruggeri et coll., 2006). Des modèles de cellules thyroïdiennes en culture ont été utilisés pour caractériser la production de l'IL-6 en réponse à divers stimuli. Dans les cellules FRTL-5, l'IL-1 stimule la sécrétion d'IL-6 et cette stimulation est augmentée en présence de TSH (Diamant et coll., 1991; Iwamoto et coll., 1991) (figure 17). Dans la lignée de cellules thyroïdiennes humaines, Htori3 (« human differentiated thyroid epithelial cells »), l'IL-6 est produite en réponse à la TSH, la FSK, l'EGF, le sérum de veau fœtal et les cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α et l'IFN- γ (Kennedy et coll., 1992) (figure 17).

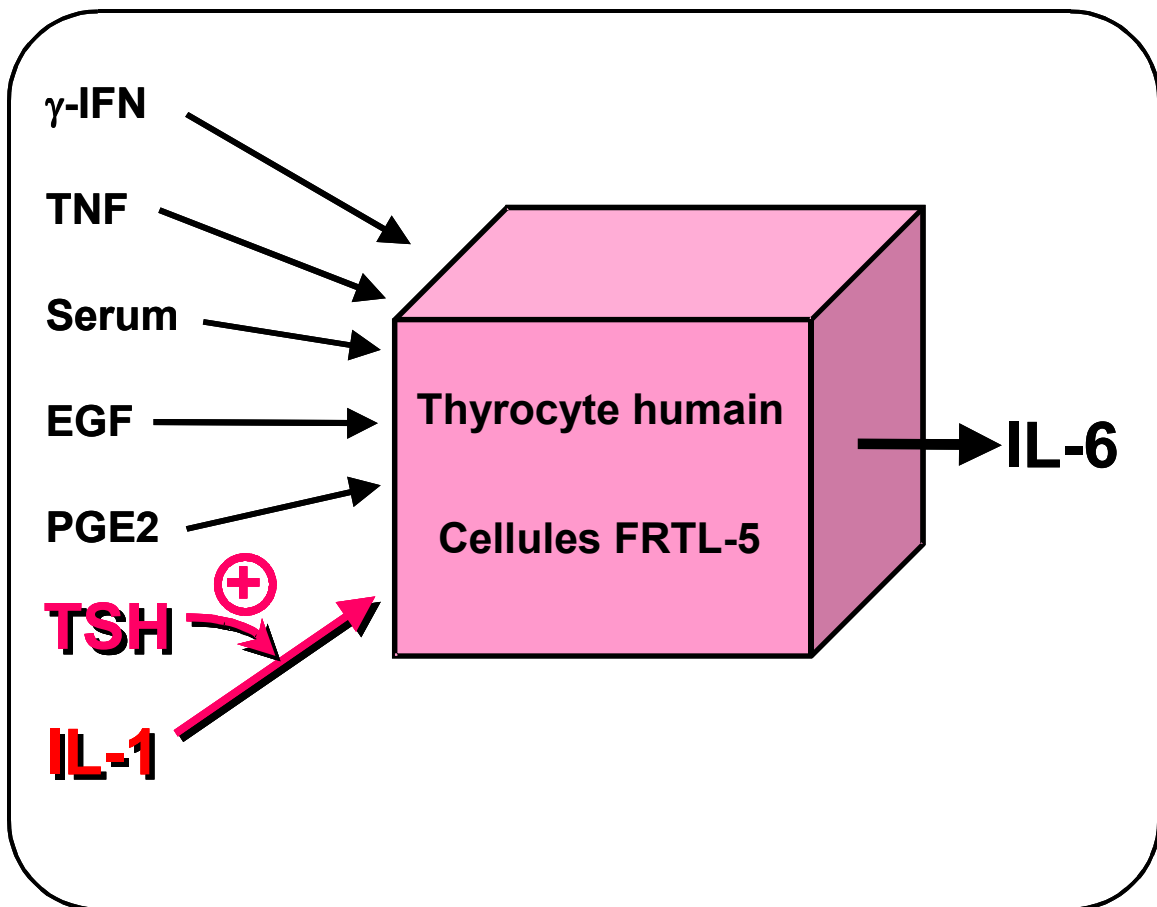


Figure 17: Production d'IL-6 par le thyrocyte en réponse à divers stimuli.

2. Régulation de la production de l'IL-6 dans le cœur

Bien que l'expression du gène de l'IL-6 ne soit pas modulée dans l'hypertrophie physiologique induite par l'exercice chez le rat (Iemitsu et coll., 2005), son niveau d'expression est, par contre, élevé dans l'hypertrophie pathologique (Haugen et coll., 2007; Kurdi et coll., 2005).

L'IL-6 aussi est produite dans le cœur en réponse à un stress mécanique comme l'étirement (Palmieri et coll., 2002). De plus, les niveaux d'IL-6 circulants sont élevés chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère (MacGowan et coll., 1997) et des études suggèrent qu'une source importante de la production d'IL-6 au cours de l'insuffisance cardiaque est le myocarde (Mari et coll., 2002).

Dans d'autres tissus musculaires, il a aussi été décrit une production d'IL-6. Ainsi, dans des biopsies de muscle squelettique, il a été mis en évidence une augmentation importante des ARNm codant pour l'IL-6 ce qui permet d'affirmer que le muscle est bien un lieu de production d'IL-6 chez l'Homme au cours de l'exercice (Keller et coll., 2001; Ostrowski et coll., 1998). C'est la voie de la calcineurine qui est impliquée dans la régulation de la transcription du gène de l'IL-6 au cours de l'exercice dans des fibres musculaires isolées de rats (Banzet et coll., 2007; Banzet et coll., 2005).

Le tissu cardiaque est composé en grande partie de cellules contractiles, véritables éléments fonctionnels de l'organe, mais aussi par de nombreuses autres cellules formant le réseau vasculaire (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales) et le tissu de soutien (fibroblastes). Toutes ces cellules sont capables de sécréter des cytokines en grandes quantités, dont l'IL-6, en particulier, lors de stimulations de type inflammatoire (Heinrich et coll., 1998).

Au niveau cellulaire, la production *in vitro* d'IL-6 a été largement étudiée dans les deux principales populations cellulaires, les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques. Selon le modèle cellulaire utilisé, les résultats sont divergents. Dans des cellules cardiaques humaines maintenues en culture primaire, l'IL-6 est produite de manière indépendante par les deux populations cellulaires (Ancy et coll., 2002). Dans des cardiomyocytes de souris adultes cultivés en présence de milieu conditionné par les fibroblastes cardiaques, la production d'IL-6 est augmentée (Fredj et coll., 2005). Dans les fibroblastes cardiaques, plusieurs études ont décrit et caractérisé la production d'IL-6 induite par l'angiotensine II (Sano et coll., 2000;

Sano et coll., 2001) ou par les récepteurs β -adrénergiques (Yin et coll., 2003; Yin et coll., 2006).

Les cardiomyocytes produisent de l'IL-6 en réponse à de nombreux stimuli tels que le stress hypoxique (Yamauchi-Takahara et coll., 1995), l'ischémie-reperfusion, le TNF- α , le LPS et l'IL-1 (Gwechenberger et coll., 1999), l'angiotensine (Sano et coll., 2000a) ou la norépinephrine (Briest et coll., 2003).

La question de l'origine cellulaire de la production intracardiaque de l'IL-6 est donc cruciale pour l'interprétation du rôle joué par cette cytokine. En effet, la signification physiopathologique de ce signal ne serait pas la même pour une protéine sécrétée par les cardiomyocytes ou par les fibroblastes cardiaques.

E. Le complexe récepteur de l'IL-6

Il a été montré que l'IL-6 se lie à un récepteur spécifique, nommé IL-6R α , CD126 ou gp80 (Yamasaki et coll., 1988), et que le complexe récepteur de l'IL-6 comprend également une sous-unité transductrice, la glycoprotéine (gp130) (Taga et coll., 1989). La gp130 induit la formation d'un complexe de haute affinité (Hibi et coll., 1990) et lorsque le récepteur est activé, deux molécules de gp130 s'homodimérisent, pour induire la transduction du signal (Murakami et coll., 1993). La stœchiométrie du complexe récepteur est un hexamère formé de deux trimères IL-6/IL-6R/gp130 qui se dimérisent (Ward et coll., 1994). Ce trimère peut être également formé à partir d'un dimère d'IL-6/IL-6R soluble (sIL-6R) qui se lie à la gp130 membranaire. Cela induit ensuite la formation d'un hexamère fonctionnel (Ward et coll., 1996).

Le nombre de cellules qui répondent à l'IL-6 est limité puisque la réponse est dépendante de l'expression du IL-6R, qui est restreinte et très finement régulée. De plus, la réponse est dépendante du recrutement des gp130 qui transmettent le signal.

Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent être subdivisés en deux (figure 18) :

- . Les récepteurs qui ne transduisent pas le signal (IL-6R, IL-11R, CNTFR)
- . Les récepteurs qui transduisent le signal (gp130, LIFR et OSMR).

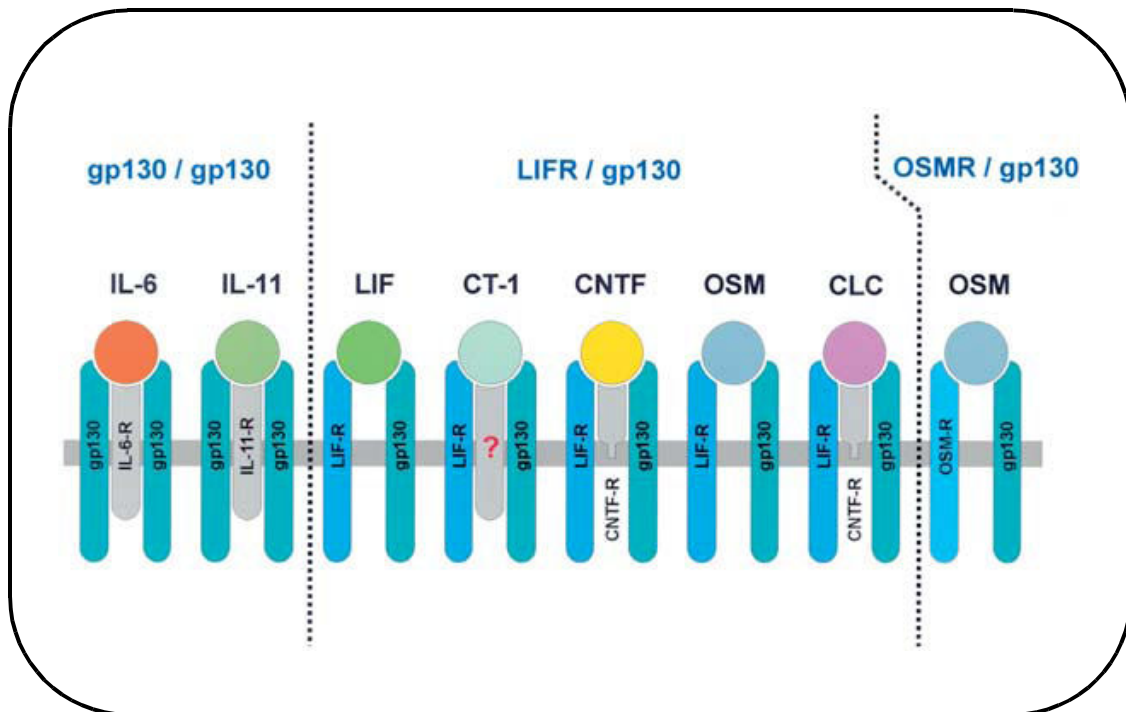


Figure 18: Les cytokines de la famille IL-6 et leurs récepteurs (extrait de Heinrich, 2003).

1. Le récepteur membranaire de l'IL-6

Le récepteur membranaire IL-6R est une glycoprotéine de 468 aa dont le gène a été cloné en 1988 (Yamasaki et coll., 1988). L'IL-6R est constitué d'une partie extracellulaire de 358 aa qui comporte un domaine IgG-like (environ 90 aa) qui serait impliqué dans le transport intracellulaire de la protéine en vue de sa sécrétion (Vollmer et coll., 1999). Le domaine transmembranaire se situe dans la région 359-386 et le domaine cytoplasmique compte 89 aa.

L'IL-6R lie spécifiquement l'IL-6 avec un Kd relativement faible, de l'ordre de 10^{-9} M. Mais ce complexe interagit avec la gp130 et il en résulte une affinité plus importante de l'ordre de 10^{-11} M (Hibi et coll., 1990) (figure 19). L'IL-6R a une demi-vie à la membrane de 15 à 30 minutes puis, il est internalisé lorsqu'il est complexé à l'IL-6 et dégradé dans les lysosomes. La réapparition d'IL-6R à la membrane nécessite une néosynthèse de la protéine qui peut prendre jusqu'à huit heures (Graeve et coll., 1996; Zohnhofer et coll., 1992). Une désensibilisation des cellules après une stimulation avec de l'IL-6 a été caractérisée. Les cellules pré-stimulées avec de l'IL-6 sont moins sensibles à l'IL-6 pendant plusieurs heures (Fischer et coll., 2004).

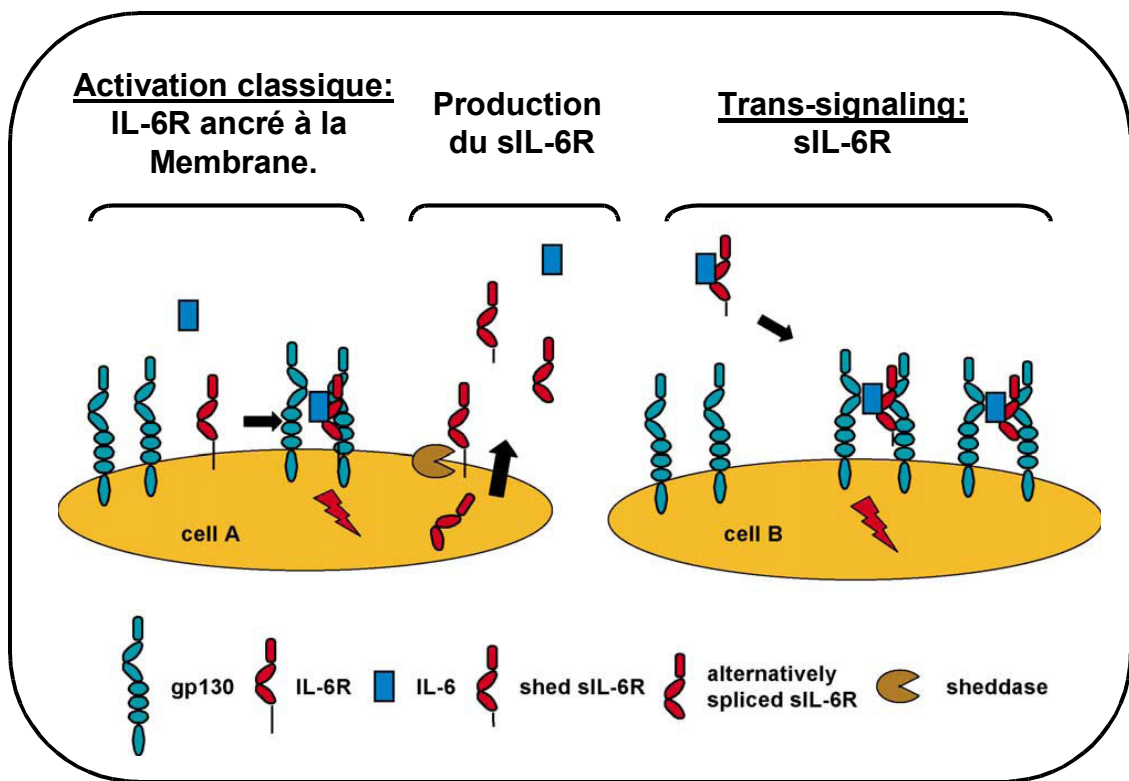


Figure 19: Deux modes d'activation du signal IL-6. (extrait de Kallen, 2002).

2. Le récepteur soluble de l'IL-6

L'IL-6R existe sous forme liée à la membrane mais également sous forme soluble : le sIL-6R (Yasukawa et coll., 1990). Il s'agit d'une forme tronquée de 50 kDa, présente dans les liquides biologiques à une concentration d'environ 25-35 ng/mL chez les individus sains mais dont le niveau est plus élevé dans de nombreux états pathologiques (Jones et coll., 2001). Par exemple, des taux élevés de sIL-6R sont détectés dans les séras de patients atteints de la maladie de Basedow (Salvi et coll., 1996), mais aussi chez les patients atteints par des cardiomyopathies hypertrophiques (Hogye et coll., 2004). Ce récepteur est capable de lier l'IL-6 puis d'interagir avec la gp130 membranaire afin d'induire un signal (Mackiewicz et coll., 1992) (figure 19).

Le sIL-6R est généré soit par protéolyse entre les aa Gln³⁵⁷ et Asp³⁵⁸ (Mullberg et coll., 1994), soit par épissage alternatif (Holub et coll., 1999) (figure 19).

Les stimuli qui entraînent des altérations ou des perturbations de la membrane cellulaire sont potentiellement des inducteurs du clivage protéolytique du IL-6R et un certain nombre ont été identifiés comme les esters de phorbol, les toxines bactériennes, les métalloprotéases bactériennes, la protéine c-réactive, la déplétion membranaire du cholestérol et récemment, la stimulation de l'apoptose (Chalaris et coll., 2007; Jones et coll., 2001). Des études récentes ont montré que deux membres de la famille des métalloprotéases dépendantes du zinc ADAM17 (*α disintegrin and metalloproteinase*), aussi nommée TACE pour TNF- α -converting enzyme, et ADAM10 contribuent au processus de clivage (Althoff et coll., 2000; Matthews et coll., 2003).

Concernant le processus d'épissage alternatif, le second mécanisme de production du sIL-6R, plusieurs équipes ont observé la présence de l'ARNm du sIL-6R qui est délété du domaine transmembranaire dans des cas de cancers comme dans les myélomes (Lust et coll., 1992; May et coll., 1988; Saily et coll., 1998; Thabard et coll., 1999) et les carcinomes du sein (Oh et coll., 1996).

Bien que les mécanismes moléculaires de production du sIL-6 sont à ce jour non-élucidés, ces observations suggèrent un rôle du mécanisme de trans-signaling de l'IL-6 (défini dans le sous chapitre 5 « voie de signalisation induites par l'IL-6 ») dans la pathologie mais aussi en conditions normales puisque ce mécanisme est aussi détecté dans diverses

lignées cellulaires et dans les cellules mononuclées du sang périphérique (Horiuchi et coll., 1994).

Afin d'évaluer le rôle *in vivo* du système IL-6/sIL-6R, des souris double-transgéniques exprimant à la fois l'IL-6 humain et le sIL-6R humain ont été générées (Peters et coll., 1997). La plus importante altération phénotypique trouvée dans ces souris est une hématopoïèse extramédullaire principalement dans le foie et la rate.

3. La glycoprotéine 130

La gp130, dont le gène a été cloné en 1990 (Hibi et coll., 1990), est une glycoprotéine de 918 aa, d'une masse moléculaire de 101 kDa, puis de 130 kDa après sa glycosylation. Ses 22 premiers aa forment le peptide signal. La protéine mature est constituée de 597 aa dans sa partie extracellulaire, 22 aa dans sa partie transmembranaire et 277 dans sa partie intracellulaire. Les protéines murine et humaine ont 76,8% d'homologie (Saito et coll., 1992). Les gp130 sont exprimées de façon ubiquiste et sont phosphorylées sur de nombreux résidus tyrosine (Y683, Y759, Y767, Y814, Y905 et Y915) lorsqu'elles sont activées par les membres de la famille de l'IL-6 (Heinrich et coll., 2003). De plus, les gp130 s'homodimérisent en réponse à l'IL-6 et à l'IL-11 alors que les autres membres de la famille de l'IL-6 conduisent à leurs hétérodimérisations avec, respectivement, le LIFR et le OSMR. Ainsi, une délétion du domaine de la gp130 qui contient les sites de liaison pour l'IL-6 et l'IL-11 n'empêche pas l'activation des facteurs de transcription STAT par le LIF ou l'OSM (Timmermann et coll., 2000). L'activation des gp130 peut donc être modulée de manière différente selon le stimulus qui l'active.

4. Formation du complexe récepteur

Les résidus cruciaux pour la liaison de l'IL-6 avec l'IL-6R sont localisés dans le CBM (cytokine Binding Module) (figure 20). Un CBM est caractérisé par une structure fonctionnelle conservée qui comporte des résidus cystéines dans le domaine N-terminal et un motif WSXWS dans le domaine C-terminal. Des études de mutagenèse du IL-6R ont montré que des résidus situés dans la boucle proche de la région charnière des deux domaines du CBM sont impliqués dans la reconnaissance de l'IL-6 mais pas le domaine IgG-like (Yawata et coll., 1993). En utilisant des mutants de délétion de la gp130 soluble, il a été montré que les

trois domaines fibronectin-type-III-like, les plus proches de la membrane, ne sont pas nécessaires pour la liaison du complexe IL-6-IL-6R (Horsten et coll., 1995) (figure 20).

Un complexe hexamérique est ainsi formé qui comprend deux molécules respectives d'IL-6, d'IL-6R et de gp130 (Boulanger et coll., 2003).

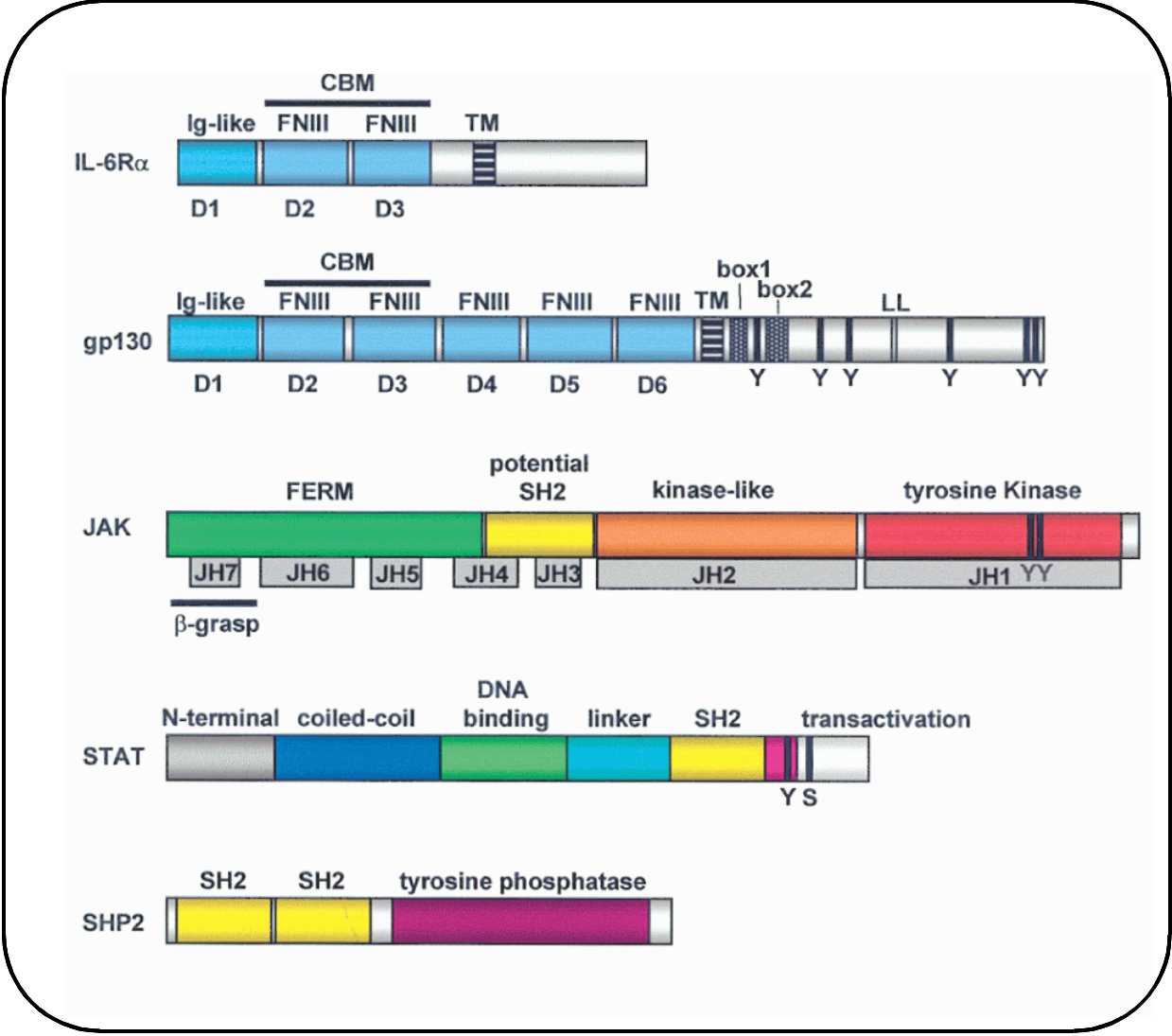


Figure 20: Structure des composants du complexe-récepteur de l'IL-6. Les tyrosines (Y) et les sérines (S) qui sont phosphorylées sont indiquées. LL indique le motif di-leucine (L786-1787). (extrait de Heinrich *et coll.*, 2003).

6. Les voies de signalisation induites par l'IL-6

Sous l'effet de l'IL-6, il y a dimérisation des gp130 ce qui conduit à activer les JAK par trans-phosphorylation. En effet, les gp130 ne possèdent pas d'activités tyrosine kinase intrinsèques mais elles lient de manière constitutive des tyrosine-kinase de la famille JAK (figure 20). Les JAK s'activent par trans-phosphorylation et elles phosphorylent des résidus tyrosine des gp130 lesquels servent de sites de liaison pour des protéines qui sont impliquées dans l'initiation de voies de signalisation (Heinrich et coll., 1998).

Aussi, dans les cellules qui n'expriment pas le IL-6R, la gp130 est activée par l'IL-6 en combinaison avec le sIL-6R par un mécanisme de « trans-signaling ». Un tel mécanisme permet aux cellules qui sont dépourvues du IL-6R, l'activation des voies de signalisation dépendantes des gp130 (Scheller et Rose-John, 2006) (figure 19).

a. La voie de signalisation JAK-STAT

Le domaine cytoplasmique de la gp130 étant dépourvu d'activité tyrosine kinase intrinsèque, après formation du complexe récepteur, déclenché par l'IL-6, trois membres de la famille des Janus Kinase tyrosines, JAK1, JAK2, et TYK2 (tyrosine kinase 2), qui interagissent fortement avec la gp130 via leur domaine FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) (figure 20), sont activés par trans-phosphorylation.

Les JAK sont liées au niveau d'une région de la gp130 située près de la membrane qui contient des motifs conservés appelés box1 et box2 (Murakami et coll., 1991) (figure 20). Par la suite, les JAK activées phosphorylent la queue cytoplasmique de la gp130 sur des résidus tyrosines qui permettent le recrutement de protéines pourvues de domaines SH2 (Schaffhausen, 1995) (figure 20). Les facteurs de transcription STAT possèdent des domaines SH2 qui vont interagir avec les phospho-tyrosine de la gp130, principalement STAT3 mais aussi STAT1. Il y a liaison sur les phospho-tyrosines de la gp130 au niveau de la séquence YXXQ pour STAT3 et YXPQ pour STAT1. Les protéines STAT sont phosphorylées par les JAK sur la tyrosine 705 pour STAT3 (Kaptein et coll., 1996) (figure 21). Par la présence de leur domaine SH2, les STAT se dimérisent en conformation tête-bêche et transloquent dans le noyau de manière spécifique (figure 21).

La translocation des STAT nécessite, de part leur taille importante (90 kDa) qui est bien supérieure à la taille limite d'exclusion du pore nucléaire, l'action d'une importine pour être

transloquées dans le noyau. Par exemple, la translocation de STAT1 en réponse à l'IFN- γ nécessite le récepteur d'import nucléaire NPI-1/importin- α 5, laquelle initie la translocation de STAT1 via un mécanisme dépendant de la petite protéine G Ran (Sekimoto et coll., 1997). Une étude récente a montré que STAT3 interagit avec le récepteur d'import nucléaire, l'importin- α 3, ce qui permet sa translocation au noyau qui est indépendante de sa phosphorylation sur la tyrosine 705 induite par l'IL-6 (Liu et coll., 2005).

Lorsque les protéines STAT ont été importées dans le noyau, elles régulent la transcription de gènes-cibles. En effet, ce sont des activateurs de transcription qui agissent sous forme homo-, ou hétéro-dimériques. Le domaine consensus de l'ADN reconnu par STAT1 et STAT3 est : TTCC(G/C)GGAA (Ihle, 1996).

De plus, l'activité transcriptionnelle des STAT peut-être modulée par phosphorylation sur des résidus sérines situés dans leur région carboxy-terminale. Ainsi, en réponse à l'IL-6, STAT3 peut-être phosphorylé sur la sérine 727 par l'activation des MAPK, mais aussi par la PKC δ , et il a été rapporté que cette phosphorylation serait nécessaire à l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Schuringa et coll., 2001; Schuringa et coll., 2000) (figure 21).

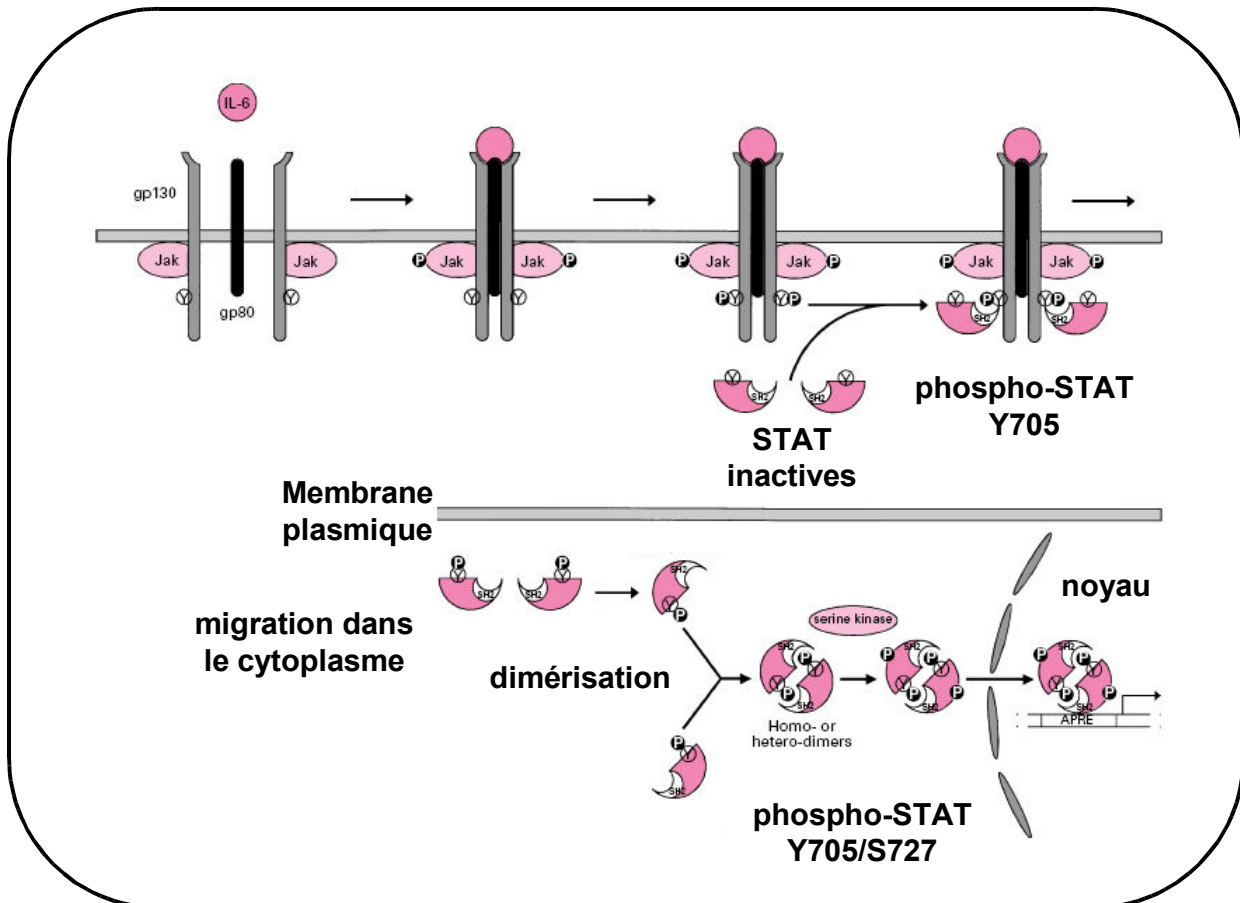


Figure 21: La voie de signalisation gp130/JAK/STAT (extrait de Heinrich, 1998).

b. la voie de signalisation SHP2-MAPK :

SHP2 est une tyrosine phosphatase dont l'expression est ubiquiste. La présence de deux domaines SH2 au niveau de son extrémité N-terminale (figure 20) permet son recrutement au niveau des motifs phospho-tyrosines de la gp130. Sa liaison avec l'une des deux sous-unités est nécessaire et suffisant pour induire ses effets biologiques (Anhuf et coll., 2000). SHP2, d'une part, inactive la voie STAT, par son activité phosphatase, et d'autre part, joue le rôle de molécule adaptatrice pour activer d'autres voies de signalisation (Heinrich et coll., 1998) (figure 22).

Ainsi, la protéine SHP2 déclenche une cascade d'événements qui aboutissent à la stimulation de la protéine Ras, ce qui conduit à l'activation des MAPK ERK1/2 (figure 22). Deux voies reliant SHP2 et Ras sont décrites : la voie dépendante de la protéine adaptatrice Gab1 (Takahashi-Tezuka et coll., 1998) et une autre voie qui implique le complexe Grb2 (« Growth factor receptor-bound protein 2 ») -Sos (« Son of sevenless ») (Fukada et coll., 1996). Gab1 joue le rôle d'un adaptateur moléculaire avec la SHP-2, la PI3K et Ras, lesquels sont impliqués dans l'activation des ERK (Takahashi-Tezuka et coll., 1998). Sos est un facteur d'échange impliqué dans l'activation de Ras et active ainsi la voie des MAPKs (Bonfini et coll., 1992). Les MAPK ainsi activées par l'IL-6 induisent à leur tour l'activation de facteurs de transcription comme C/EBP β (Akira, 1997). Il s'agit d'un membre de la famille C/EBP qui se lie à la séquence consensus d'ADN : ACATTGCACAATCT (Ramji et Foka, 2002). D'autres facteurs de transcription sont phosphorylés par les ERK1/2 activées (c-myc, Elk-1, AP-1) (Chang et coll., 2003).

Comme Gab1 permet le recrutement de la PI3K (Takahashi-Tezuka et coll., 1998), l'IL-6 par l'intermédiaire de SHP-2/Gab1 peut activer une troisième voie de signalisation : la voie PI3K/Akt (figure 22). L'activation de cette voie en réponse à l'IL-6 est décrite dans les carcinomes (Jee et coll., 2002), les myélomes (Shi et coll., 2002) et les hépatomes (Chen et coll., 1999).

Les voies de signalisation dépendantes de SHP2 (MAPK et PI3K) sont encore mal connues et leurs activations en réponse à l'IL-6 est dépendante du type cellulaire.

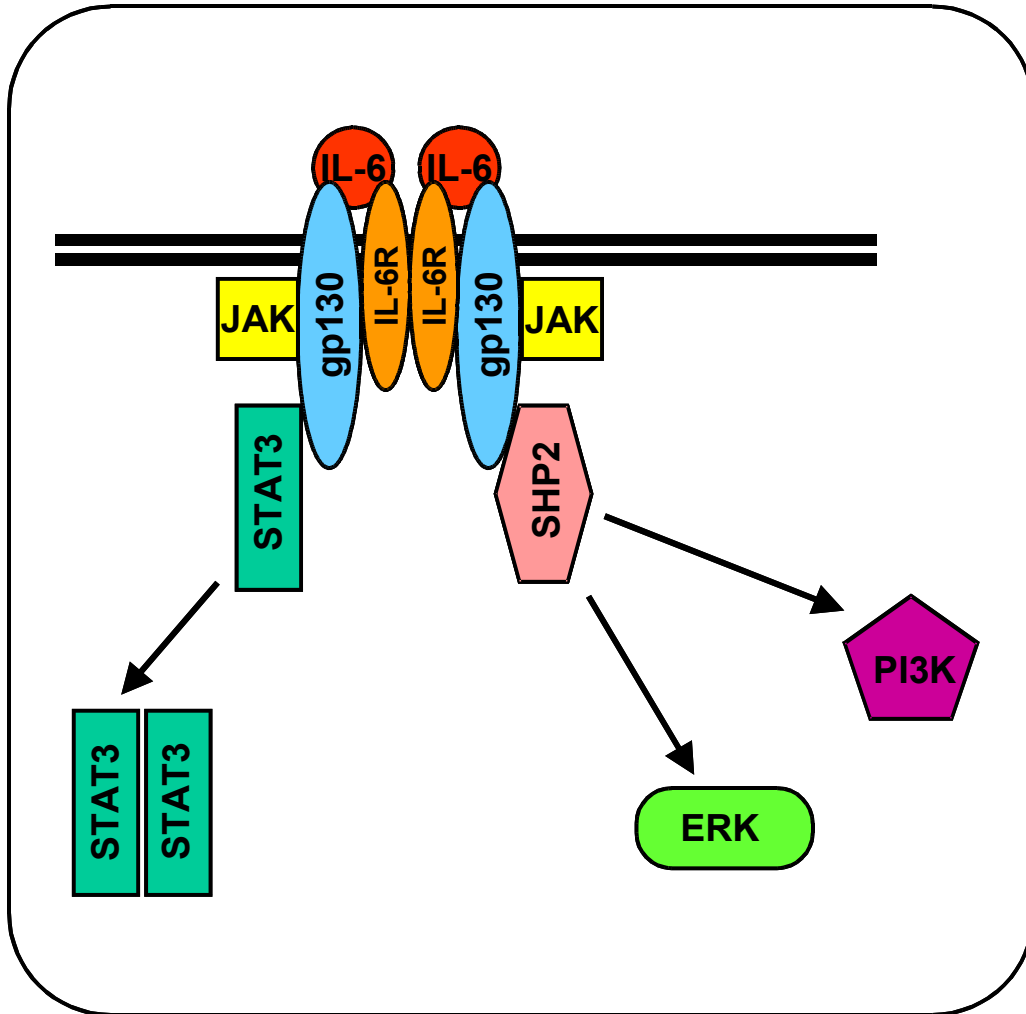


Figure 22: Voies de signalisation de l'IL-6

7. Terminaison du signal de l'IL-6

Plusieurs mécanismes impliqués dans la terminaison du signal activé par l'IL-6 sont proposés. Après la formation du complexe-récepteur, l'IL-6R et la gp130 sont co-intériorisés (Thiel et coll., 1998). La tyrosine phosphatase SHP2 (SH2 (Src homology domain 2)-containing protein tyrosine phosphatase) est recrutée au niveau du motif phosphotyrosine 759 de la gp130 et neutralise l'activation du récepteur et l'activation des STAT (Lehmann et coll., 2003). Enfin, le rétro-contrôle négatif du signal induit par l'IL-6 implique SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) qui est recruté au niveau du même motif qui inhibe l'activité des JAK (Janus kinase) (Jack... (Nicholson et coll., 2000).

F. Effets biologiques

L'IL-6 est une cytokine pléiotrope qui possède une grande variété d'effets biologiques. Historiquement, les premiers effets de l'IL-6 rapportés étaient des effets immunologiques.

Tout d'abord, l'IL-6 a été décrite comme un facteur stimulant, d'une part, la différenciation terminale des lymphocytes B (Okada et coll., 1983) et d'autre part la différenciation des macrophages (Nicola et coll., 1983). Des études ont montré que l'IL-6 stimule la prolifération des cellules T, la différenciation des cellules T cytotoxiques et la maturation des mégacaryocytes (Ceuppens et coll., 1988; Ishibashi et coll., 1989; Okada et coll., 1988). Par la suite, il a été mis en évidence des effets « non-immun » de l'IL-6 dans des types cellulaires très variés. Ainsi, lors de la réponse de la phase aiguë qui est l'adaptation d'un organisme en réponse au déséquilibre de son homéostasie du à un stress (Heinrich et coll., 1990), il y a un changement important de certaines protéines plasmatiques nommées protéines de la phase aiguë. L'IL-6 est connu pour stimuler la production des protéines de la phase aiguë dans les hépatocytes, comme la CRP (C-reactive protein) ou l'amyloïde A sérique chez l'Homme (Gauldie et coll., 1987).

L'IL-6 stimule la formation des ostéoclastes (Tamura et coll., 1993) et est considérée comme un facteur de croissance pour les cellules rénales mésangiales (Horii et coll., 1989) ainsi que pour les kératinocytes épidermiques (Grossman et coll., 1989).

1. Effets dans la thyroïde

Dans les thyrocytes, peu d'effets de l'IL-6 ont été rapportés. L'effet de l'IL-6 au niveau de l'apoptose dans la thyroïde est peu connu.

En présence de TSH, l'IL-6 stimule la synthèse d'ADN (Nishiyama et coll., 1993). L'IL-6 pourrait exercer un effet inhibiteur sur la différenciation et la fonction du thyrocyte puisque dans des cultures de thyrocytes humains provenant de patients développant une maladie de Basedow, l'IL-6 inhibe l'expression du gène de la TPO et la sécrétion de T3 stimulés par la TSH (Tominaga et coll., 1991). Par contre, la production de la Tg n'est pas affectée par l'IL-6 (Krogh Rasmussen et coll., 1991). Dans les cellules FRTL-5, l'IL-6 a été rapporté pour inhiber l'expression du NIS (Spitzweg et coll., 1999) et l'expression de la désiodase de type I (Hashimoto et coll., 1995).

2. Effets dans le cœur

Dans les cardiomyocytes de rat adulte, l'IL-6 pourrait être impliqué dans la fonction du RS par un mécanisme impliquant une production de GMPc et l'activation de la PKG (Yu et coll., 2005a; Yu et coll., 2005b). Donc, une stimulation chronique d'IL-6 aurait des effets inotropes négatifs. De plus, l'IL-6 augmente la production d'anion peroxyde (O_2^-) et de peroxyde d'azote ($ONOO^-$) mais leurs rôles n'ont pas encore été caractérisés.

L'IL-6 stimule le dépôt anormal de collagène (Sarkar et coll., 2004) mais aussi induit la diminution de l'expression de l'ARNm de la SERCA tout en stimulant en même temps l'expression des ARNm de l'ANF et du BNP (Tanaka et coll., 2004).

L'IL-6 pourrait contribuer à l'hypertrophie cardiaque et c'est un marqueur important du dysfonctionnement diastolique, de la fraction d'éjection, du risque et de la sévérité de l'insuffisance cardiaque (Terrell et coll., 2006). La génération de souris transgéniques sur-exprimant l'IL-6 et/ou son récepteur a permis de montrer que seules les souris double-transgéniques expriment le phénotype hypertrophique. Ces résultats suggèrent qu'il faut à la fois une sur-expression de l'IL-6 et du IL-6R pour activer les gp130 et pour conduire à l'hypertrophie cardiaque (Hirota et coll., 1995). Une étude effectuée *in vivo*, a montré que l'IL-6 en présence du sIL-6R protège le cœur reperfusé de l'apoptose après une ischémie permettant une réduction significative de la taille de la zone infarctée (Matsushita et coll., 2005). Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'IL-6 a aussi un effet protecteur dans l'ischémie/reperfusion et cet effet semble impliquer l'activation de la PI3K et la voie de

synthèse du NO (Smart et coll., 2006). Enfin, dans un modèle de choc hémorragique chez le rat, l'administration d'anticorps dirigés respectivement contre l'IL-6 et contre le sIL-6R réduit l'expression d'ICAM ou l'activité de NF- κ B, ce qui améliorerait la fonction cardiaque (Yang et coll., 2007; Yang et coll., 2006).

L'ensemble de ces études suggère qu'il existe une relation entre la fonction cardiaque et les taux d'IL-6 et du sIL-6R intracardiaques aussi bien dans un contexte physiologique que dans un contexte pathologique.

OBJECTIF DU TRAVAIL :

Dans un contexte physiologique, l'AMPc est donc un second messenger important dans la régulation du thyrocyte et du cardiomyocyte. Dans un contexte, physiopathologique, les voies activées par ce second messenger peuvent être altérées, mais surtout peuvent interagir avec d'autres voies de signalisation dont l'activation est déclenchée en réponse à un stress, comme par exemple, l'activation par les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, il existe de nombreuses interconnexions possibles entre les voies de l'AMPc et celles activées par les cytokines pro-inflammatoires. Le but général de ce travail a été d'étudier les dialogues entre ces voies de signalisation qui peuvent conduire à une réponse cellulaire comme la production de la cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6, dans des cellules où l'AMPc a un rôle « positif ». L'IL-6 produit pourrait avoir des effets para-endocrines et/ou autocrines sur le thyrocyte et sur le cardiomyocyte.

Le premier objectif du travail a été de caractériser les mécanismes moléculaires de l'effet de l'AMPc sur la production d'IL-6 en réponse à l'IL-1 dans les cellules FRTL-5.

Nous avons aussi étudié l'activation des voies de signalisation de l'IL-6 dans ce type cellulaire et nous avons essayé d'évaluer l'effet de l'IL-6 sur l'expression des marqueurs de différenciation et au cours de la progression du cycle cellulaire.

Le second objectif du travail a été de mettre en évidence une production de l'IL-6 par les cardiomyocytes en réponse à l'AMPc et à l'IL-1 et de caractériser les voies de signalisation qui conduisent à la sécrétion d'IL-6.

L'IL-6 sécrétée pourrait avoir des effets autocrines, c'est pourquoi, il était intéressant d'étudier l'activation des voies de signalisation en réponse à l'IL-6 et son effet dans l'expression de plusieurs marqueurs associés à l'hypertrophie, puisque certains membres de la famille de l'IL-6 (LIF, CT) étaient connus pour être pro-hypertrophiques. La contribution du récepteur soluble dans ces mécanismes a aussi été étudiée.

Pour atteindre l'un de ces objectifs, le modèle cellulaire que nous avons utilisé est la lignée de cellules thyroïdiennes FRTL-5. Dans ces cellules, la TSH et l'AMPc régule positivement la prolifération et les marqueurs de différenciation. De plus, elles possèdent les principales caractéristiques du thyrocyte et elles permettent de réaliser facilement des études biochimiques ou moléculaires.

Le second modèle d'étude utilisé est le cardiomyocyte ventriculaire de rat adulte en culture primaire. Ce modèle est très proche du cardiomyocyte *in situ* en termes

de différenciation et de fonction et constitue donc un matériel de choix pour une étude dans un contexte physiologique. Dans ces cellules, les catécholamines et l'AMPc stimulent la contractilité qui est la fonction principale du cardiomyocyte.

MATERIELS ET METHODES

I. PRODUITS

A. Stimuli

L'IL-1 recombinante de rat, l'IL-6 recombinante de rat, l'IL-6 recombinante humaine et le récepteur soluble de l'IL-6 (sIL-6R) recombinant humain proviennent de chez PeproTech. Le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'actinomycine D, la toxine cholérique (CT), l'ISO, proviennent de chez Sigma. La FSK, la ddFSK et la toxine de Pertussis (PTX) sont des produits de chez Calbiochem EMD Biosciences Inc. (Darmstadt, Allemagne).

Le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, le CPT-cAMP et l'inhibiteur de la PKA, le H89 (N-[2-bromocinnamylaminoethyl]-5-isoquinoline sulfonamide), proviennent de Biolog (Bremen, Allemagne).

B. Culture cellulaire

Le milieu F12 modifié par Coon et le sérum de veau nouveau-né sont distribués respectivement par Biochrom AG (Berlin, Allemagne) et par Biowest (Nuaille, France).

La TSH, l'INS et la transferrine ont été commandées chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

C. Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été commandés chez MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne).

D. Anticorps

Les anticorps anti-phospho-Stat3 (Tyr705), -phospho-c-jun (ser63) -phospho-c-jun (ser73), -PKA-phospho-substrates, -phospho-ERK5 (Thr218-Tyr220), -phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204), -phospho-p70S6K (Thr421-Ser424 et Thr389), -phospho-S6-ribosomal-protein (Ser235-236), -phospho-CREB (Ser133), -ERK5, -CREB proviennent de chez Cell Signaling Technology (Inc., Beverly, MA). Les anticorps anti-ERK1/2 sont distribués par Invitrogen. Les anticorps anti-c-Jun, -JunD, -JunB, -Fra-1, -Fra-2, -FosB, -ATF1, -HDAC1,-STAT3 ont été commandés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti c-fos proviennent de Upstate (Lake Placid, NY) et les anticorps anti-

tubuline- α , -actine- β et les anticorps anti-calsequestrine proviennent, respectivement de chez SIGMA et de chez AffinityBioReagent. Les anticorps anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris conjugués à la HRP proviennent de Promega ; les anticorps anti-IgG de chèvre conjugués à la HRP sont commandés chez DakoCytomation.

II. CULTURE CELLULAIRE

A. La lignée cellulaire FRTL-5

La lignée cellulaire thyroïdienne de rat FRTL (Fischer Rat Thyroid Cell) a été établie en 1980 (Ambesi-Impiombato et coll., 1980) et un clone a été isolé en présence de 5% de sérum (FRTL-5) (Vitti et coll., 1983). La lignée FRTL-5 que nous avons utilisé est un don du Dr. Eggo (Birmingham, Royaume-Uni) et elle a été cultivée dans un milieu complet qui contient 5% de sérum de veau nouveau-né inactivé par la chaleur, 2 mM Glutamax (L-aspartyl-L-glutamine, Gibco), un mélange d'antibiotiques et d'antimycotique (100 U/ml pénicilline G, 100 μ g/ml streptomycine, 250 ng/ml amphotéricine B ; Gibco) et en présence de trois hormones : TSH (0,5 mU/ml), INS (10 μ g/ml), transferrine (5 μ g /mL). Les cellules FRTL-5 ont poussé à 37°C sous atmosphère humide en présence de 5% de CO₂.

Ce modèle cellulaire constitue un modèle de choix car ce sont des cellules immortalisées, mais non-transformées, qui expriment les principaux marqueurs de différenciation thyroïdiens (Bidey et coll., 1988; Damante et Di Lauro, 1994) et leur croissance, qui est dépendante de l'INS/ IGF-1, est potentialisée en présence de TSH (Kimura et coll., 2001). En effet, il est suggéré qu'il existe différents lots ou sous clones de cellules FRTL-5, chacun avec leurs propriétés propres.

Dans l'équipe, il a été montré dans la lignée de cellules FRTL-5, que nous utilisons, que la FSK n'a pas d'effet sur la progression du cycle cellulaire alors que l'INS la stimule et cet effet est potentialisé par la FSK (Correze et coll., 2005).

Cependant, l'établissement de cette lignée a entraîné la perte de la polarisation des cellules (FRTL-5 today, 1989). De plus, il suffit d'un seul oncogène pour les transformer (Fusco et coll., 1987), ce qui suggère leur nature pré-transformée. En effet, injectées dans la souris « nude », les cellules FRTL-5 entraînent le développement de tumeurs qui est dépendant de la TSH (Ossendorp et coll., 1990).

Expérimentalement, les cellules FRTL-5 sont transfectables avec une efficacité suffisante pour étudier des régulations (Pomerance et coll., 2003).

1. Passages

La lignée cellulaire a été entretenue par passages successifs à 90% de confluence dans des flacons de 75 cm² (Falcon).

Le flacon est rincé 2 fois avec 15 mL de PBS (sans calcium, ni magnésium) (GIBCO) qui a été préalablement chauffé à 37°C. Puis, 1 mL de trypsine/EDTA (GIBCO) est ajouté et le flacon est placé dans l'incubateur pendant 2 à 3 minutes. Les cellules sont décollées à la pipette en déversant 3 à 5 fois la suspension cellulaire trypsinée. La réaction de trypsination est arrêtée avec l'ajout de 5 mL de milieu complet. La suspension cellulaire et le rinçage du flacon avec 5 mL de milieu complet sont transférés sur un tamis de 40 µm. La suspension cellulaire filtrée est diluée dans du milieu complet.

Classiquement, pour l'entretien de la lignée, 1 flacon trypsiné est repiquée en 3 à 4 flacons.

2. Congélation des cellules

Un flacon à 70% de confluence est rincée 2 fois avec du PBS. 2 mL de trypsine-EDTA sont ajoutés et bien répartis puis 1 mL de trypsine est retiré. Le flacon est placé dans l'incubateur 2 à 3 minutes puis la trypsination est arrêtée avec 7 mL de milieu de Coon à 5% de sérum de veau nouveau-né. Le flacon est rincé avec 3 mL de milieu additionnel. Les 10 mL de suspension cellulaire sont transférés dans un tube 15 mL (Falcon) et sont centrifugés à 900 rpm pendant 7 min. Le culot cellulaire est repris dans 500 µL de milieu de Coon à 20% de sérum de veau nouveau-né et il est incubé dans la glace. 500 µL d'une solution de milieu de Coon à 20 % de sérum de veau nouveau-né en présence de 20% de DMSO (SIGMA ; D4540 cell culture tested) sont ajoutés goutte à goutte tout en agitant délicatement le tube. La suspension cellulaire est transférée dans un cryotube à vis de 2 mL et il est congelé à -80°C la nuit dans une boîte polystyrène cotonnée. Après congélation, le tube est conservé dans l'azote liquide.

3. Décongélation des cellule

Un cryotube est extrait de l'azote liquide puis est mis à décongeler dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la décongélation partielle (la suspension cellulaire est encore congelée au centre du cryotube). Le cryotube est ensuite placé à température ambiante et, rapidement, la suspension cellulaire est reprise dans du milieu de Coon à 10% de sérum de veau nouveau-né, puis transférée dans un flacon de 25 cm² (Falcon). Après adhésion des cellules, le milieu de culture est renouvelé. À 70-80% de confluence, les cellules sont repiquées dans un flacon de 75 cm².

B. Les cardiomyocytes de rats adultes

Les expériences que nous avons menées sur les cardiomyocytes de rats sont conformes avec the European Community guiding principles (86/609/CEE), animals *CE Off J* n° L358, 18 Décembre 1986, avec l'utilisation du guide du comité d'éthique (CREEA Ile- de-France Sud) et sont conformes au décret français n°87-848 du 19 octobre, 1987 (*J de la République Française*, 20 octobre 1987, pp. 12245-12248). Les autorisations pour effectuer les expériences ont été obtenues auprès du Ministère français de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation (n°7475, 27 mai, 1997).

1. Protocole de dissociation

La technique utilisée est la perfusion rétrograde par l'aorte d'un cœur monté sur un système de Langendorf (Mery et coll., 1991) avec quelques modifications. Les différents solutions et tampons utilisés au cours de la dissociation sont présentés figure 23.

2 coupelles contenant 10 mL de solution A sont refroidies à -20°C, afin de refroidir la solution qui servira à recueillir le cœur.

La solution A de lavage ainsi que la solution B de collagénase A sont filtrées.

Les rats Wistar males (160-180 g) sont anesthésiés avec 0,5 mL de Pentobarbital par injection intra-péritonéale ce qui correspond à une dose de 50 mg/mL de sang. Après avoir vérifier l'état endormi du rat en exerçant une forte pression sur l'une de ses pattes antérieures, la cage thoracique est rapidement ouverte et le cœur est prélevé. Après avoir mis le cœur dans la première coupelle pour le rincer de son sang, il est placé dans la seconde ou les morceaux de poumons et de thymus, éventuellement présents, sont enlevés afin de dégager l'aorte.

Le cœur est alors canulé puis lavé pendant 4 min avec la solution A puis 1 min avec la solution B de collagénase A (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) en circuit ouvert (débit 6 mL/min).

La dissociation enzymatique du cœur est effectuée pendant 1 heure en circuit fermé (débit 4 mL/min) avec le solution B de collagénase A et le cœur est récupéré dans une coupelle contenant 10 mL de solution C. Les oreillettes ainsi que l'aorte sont retirés. Les ventricules sont alors émincés à l'aide d'une paire de ciseaux fins. Les morceaux sont agités dans la coupelle puis filtrés sur un tamis de nylon dans deux tubes de 10 mL.

Les cellules sont décantées et les culots sont repris dans un volume final de 10 mL de solution C. Cette étape sert à séparer les fibroblastes et les cardiomyocytes en fonction de leurs tailles. Les cardiomyocytes sont plus volumineux et vont sédimenter plus rapidement que les autres types cellulaires.

Les 10 mL de suspension cellulaire sont placés dans un erlenmeyer de 25 mL qui est mis sous agitation lente dans un bain marie. Après 5 min, 20 μ L de CaCl_2 à 25mM (ce qui correspond à 70-75 μ M de Ca^{2+} libre) sont ajoutés et après 10 min, 100 μ L de CaCl_2 sont rajoutés (équivalent à 320-325 μ M de Ca^{2+} libre) et la suspension cellulaire est versée dans un tube à hémolyse pour effectuer une seconde décantation.

Le surnageant est aspiré et le culot est resuspendu avec 10 mL de solution D. Cette étape permet de séparer les cellules mortes des cellules vivantes lors de cette décantation. Une décantation supplémentaire avec la solution D est réalisée.

A ce niveau, 20 μ L de la suspension sont prélevés pour effectuer un comptage du nombre de cellules sur une cellule de Malassez. Les cardiomyocytes sont alors répartis dans des boîtes de pétri Falcon de 60 mm de diamètre (200 000 à 300 000 cellules par boîte) qui ont été préalablement tapissées en laminine (1 mg/mL, Invitrogen) et qui contiennent du milieu MEM (SIGMA) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C saturée en humidité et à 5% de CO_2 pendant 2 heures puis le milieu est remplacé par un milieu de déprivation (sans sérum). Les boîtes sont placées dans l'étuve pendant 24 heures.

Les cardiomyocytes de rats adultes obtenus ont une structure en bâtonnet striée caractéristique (Figure 9). Nous avons utilisé ce modèle cellulaire pour nos expériences car il est plus proche du cardiomyocyte humain. Cependant, du fait de son état hautement différencié, ce modèle n'est pas transfectable, à l'inverse des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, ce qui nous a limités dans l'étude expérimentale *in vitro*.

A

Composé	Poids Molaire (g/mole)	Concentration molaire (milliMolaire)
NaCl	58,4	117
KCl	74,5	5,7
NaHCO ₃	84	4,4
KH ₂ PO ₄	136	1,5
MgCl ₂ (6H ₂ O)	203	1,7
HEPES	238	21
Glucose	180	11,7
Créatine	131,1	10
Taurine	125	20

B

Solution A
. Solution stock à pH 7,1 à température ambiante (environ pH 6,8 à 37°C). Le calcium libre correspond au calcium de l'eau distillée.
Solution B
. 25 mL de solution stock . 25 mg de collagénase A . 78 µL d'EGTA . 280 à 310 µL de CaCl ₂ Le calcium libre est d'environ 20-25 µM.
Solution C
. 40 mL de solution stock . 25 µL de CaCl ₂ Le calcium libre est d'environ 20-25 µM.
Solution D
. 20 mL de solution stock . 100 mg de BSA (5 mg/mL) . 25 µL de CaCl ₂ . pH 7,6 à température ambiante (environ pH 7,4 à 37°C). Le calcium libre est d'environ 300 µM.

Figure 23: Composition des solutions utilisées lors de la dissociation des myocytes cardiaques. A) Composition de la solution stock. B) Compositions des différentes solutions utilisées aux cours des différentes étapes de la dissociation des myocytes cardiaques.

A. Extraits totaux

Les cellules FRTL-5 ont étéensemencées dans des boîtes de 100 mm de diamètre (Falcon) et sont cultivées jusqu'à atteindre la confluence. Puis les cellules ont été déprivées pendant 3 à 4 jours et ont été incubées en présence des différents agonistes. Les cardiomyocytes sont déprivés en sérum pendant 24-48 heures puis sont stimulés.

Les cellules ont été lysées 20 min à 4°C avec le tampon de lyse HNTG (50 mM Hepes pH 7.4, 400 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycérol, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM pyrophosphate de sodium, 100 mM fluorure de sodium) (inhibiteur de phosphatases) complété avec un inhibiteur des tyrosine-phosphatases (1 mM d'orthovanadate de sodium Na₃VO₄) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Table 3). Les lysats cellulaires ont été centrifugés 15 minutes à 12 000 g à 4°C. Les surnageants ont été aliquotés et congelés à -80°C.

B. Extraits solubles cytoplasmiques

Après stimulation, les cellules sont rincées avec du tampon β-glycérophosphate glacé (80 mM β-glycérophosphate pH 7,4 ; 20 mM EGTA ; 15 mM MgCl₂) puis elles sont grattées dans du tampon β-glycérophosphate glacé en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. La fraction soluble cytoplasmique est obtenue en centrifugeant les échantillons à 100 000 g à 4°C pendant 30 min (Ultracentrifugeuse TL-100 Beckman). Après centrifugation, les surnageants sont aliquotés et sont conservés à -80°C.

C. Extraits nucléaires

Après stimulation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, puis elles sont lysées 15 min dans un tampon de lyse cytoplasmique (20 mM Hepes pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 200 mM Sucrose ; 10 mM KCl ; 10mM β-glycérophosphate ; 1mM DTT) qui contient 0,5% de Triton et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les extraits sont centrifugés 10 min à 4°C à 1000 g. Le surnageant (fraction cytoplasmique) est éventuellement aliquoté et conservé au -80°C. Le culot contient les noyaux intacts et celui-ci est lavé une fois avec du tampon de lyse cytoplasmique puis il est centrifugé 10 min à 4°C à 1000 g. Le culot est repris dans du

tampon de lyse nucléaire (20 mM Hepes pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 400 mM NaCl, 10mM β-glycérophosphate ; 1mM DTT) en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

La lyse nucléaire fait apparaître un précipité blanchâtre. Ainsi, au cours de 30 minutes d'incubation à 4°C, le culot est homogénéisé avec un homogénéiseur de Dounce (une dizaine d'aller-retour par échantillon). Le lysat nucléaire est centrifugé 15 min à 20 000 g à 4°C.

Le surnageant contient les protéines nucléaires que l'on aliquote et que l'on conserve à -80°C.

inhibiteur	Antipain	Leupeptine	Pepstatine	Soybean trypsin inhibitor	Aprotinine	Benzamidine
cibles	papain, trypsin.	sérine thiol protéases (trypsin, protéinase K, thrombine, papain).	aspartic protéases	trypsin	sérine protéases	sérine protéases
optimum	50 µg/mL	0,5 µg/mL	0,7 µg/mL	10-100 µg/mL	2 µg/mL	1 mM
Concentration finale	1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	1 mM

Table 3: Composition du cocktail d'inhibiteurs de protéases.

IV. QUANTIFICATION DES ARN

A. Extraction

Après stimulation, les ARN totaux des cellules FRTL-5 (à confluence) ou des cardiomyocytes (300 000 cellules par boîte), qui ont été préalablement broyés (broyeur-homogénéiseur Precellys®, Bertin) sont extraits en utilisant le kit RNABle (Eurobio, les Ulis, France). Le RNABle est une technique dérivée de la technique de Chomczynski (Chomczynski et Sacchi, 1987)

Le RNABle initie la formation de complexes entre l'ARN et l'isothiocyanate de guanidine et permet de rompre les interactions hydrophiles entre l'ADN et les protéines. L'ADN et les protéines sont dans la phase organique alors que les ARN sont dans la phase aqueuse.

Les cellules sont grattées dans 1 mL de RNABle puis 100 µL de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont incubés 15 min dans la glace avec une agitation vigoureuse toutes les 5 min puis ils sont centrifugés à 10 000 g à 4°C pendant 15 min. Après centrifugation, la phase aqueuse, contenant les ARN (environ 50% du volume total), est transférée dans un nouveau tube auquel on ajoute 1,2 volume d'isopropanol. Les ARN sont précipités la nuit à -20°C.

Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 15 min. Un culot blanchâtre apparaît au fond du tube, ce sont les ARN précipités. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est lavé 2 fois avec 1 ml d'éthanol à 75%. Après chaque lavage, une centrifugation est effectuée à 12 000 g à 4°C pendant 5 min.

Les culots d'ARN sont séchés pendant 20 min et repris dans 14-20µl d'eau RNase/DNase free (Gibco) en présence de RNase out au 1/100 (Invitrogen). Les ARN sont solubilisés pendant 1 heure à 4°C en tapotant de temps en temps les tubes.

Les échantillons d'ARN sont stockés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

B. Quantification de la concentration et évaluation de la qualité

La méthode la plus courante pour évaluer la concentration en ARN d'un échantillon donné est la mesure de l'absorbance (ou densité optique ; DO) à 260 nm. Celle-ci est effectuée au spectrophotomètre (Eppendorf).

Chaque échantillon d'ARN est dilué au centième dans de l'eau (facteur de dilution ; FD). Le volume total (Vt en μL) est ensuite transféré dans une cuve UVette (Eppendorf) et l'absorbance à 260 nm et à 280 nm est mesurée.

L'absorbance à 260 nm indique la teneur en ARN et en appliquant la formule suivante, on obtient une concentration en ARN de l'échantillon (C_{ARN}) :

$$C_{\text{ARN}} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{DO}_{\lambda=260\text{nm}} \times 40 \times \text{FD}) / Vt$$

Les ratios R des absorbances à 260 nm sur celles à 280 nm permettent d'évaluer la présence de protéines contaminantes. Ainsi, on considère que l'échantillon d'ARN est de bonne qualité quand : $1,60 < R < 2,00$

Enfin, on peut déposer sur gel d'agarose, en présence de bromure d'éthidium, un aliquot d'échantillon d'ARN afin de visualiser la qualité de l'échantillon, en d'autre terme, afin de vérifier la présence de dégradation dans l'échantillon. En effet, il est admis que la composition en ARN (chez les eucaryotes) pour un échantillon est la suivante :

- ARN messagers : 2 à 4%
- ARN de transfert : 15 %
- ARN ribosomiaux : 80%

Après, migration du gel puis visualisation sous ultraviolet (source d'excitation du bromure d'éthidium), on observe 2 bandes majoritaires correspondant, respectivement, aux ARNr 18S et 28S ; S est le coefficient de sédimentation exprimé en unités Svedberg. Si l'échantillon d'ARN analysé est de bonne qualité, l'intensité de la bande 28S est environ le double de celle de la bande 18S. Par contre, si on observe un « smear » ou bien une diminution de l'intensité du 28S, l'échantillon d'ARN est complètement ou partiellement dégradé et donc il est inutilisable.

Nous avons aussi utilisé une technologie récente afin d'avoir une meilleure appréciation de la qualité de nos échantillons d'ARN tout en utilisant une quantité plus faible d'ARN que celle utilisée pour la migration sur gel d'agarose. Nous avons utilisé la lecture de puces LabChip sur un Bioanalyser (Agilent Technologies). Le principe de cet appareil repose sur la séparation des molécules d'ARN en fonction de leur taille dans un système d'électrophorèse capillaire microfluidique. L'ARN se lie à un intercalant présent dans le gel, ce qui permet sa détection ($\lambda_{\text{excitation}} = 620-645 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{détection}} = 674-696 \text{ nm}$). Les résultats apparaissent sous forme d'électrophorégramme ou apparaissent un pic de référence, un pic pour les petits ARN (ARNt, ARN 5S...), un pic pour les ARNr 18S et un pic pour les ARN 28S.

L'analyse des résultats nous permettent d'évaluer la qualité selon plusieurs critères :

- Le RNA Integrity Number (RIN) : c'est une mesure automatisée de l'intégrité (dégradation) de l'ARN et de sa contamination en ADN génomique. Sa valeur est comprise entre 1 (ARN complètement dégradé) et 10 (ARN intact).

- La présence d'ADN génomique contaminant est indiquée par un grand pic au niveau des petits ARN, par des pics supplémentaires en fin de tracé ou entre les pics des ARN 18S et 28S.

Le seuil d'acceptabilité du RIN dépend de la technique de mesure du transcriptome utilisée en aval. Pour la PCR en temps réel, le RIN doit être au moins égal à 6. Dans nos expériences, nous avons travaillé avec des échantillons d'ARN dont le RIN était au moins égal à 7.

C. Synthèse, purification et marquage de la sonde IL-6

La sonde d'ADNc d'IL-6 de rat (P-IL6) est isolée par RT-PCR avec les amorces suivantes

- Amorce sens : 5'-CTCTCCGCAAGAGACTTCCA-3'
- Amorce antisens : 5'-TGGTCTTCTGGAGTTCCGTT-3'

Puis, la sonde, ayant subi une extension de polyA, a été clonée dans un vecteur TopoTA-cloning. Après transformation bactérienne et purification plasmidique, la vérification de la présence de l'insert dans le plasmide a été vérifiée, d'une part, par PCR en utilisant une amorce spécifique pour le vecteur Topo et l'amorce sens ou antisens et d'autre part, par analyse des profils de restriction avec les enzymes Nde I et BamHI. La sonde est extraite du vecteur recombinant par coupure avec l'enzyme de restriction EcoRI.

La sonde est marquée radioactivement en réalisant une extension d'amorçage aléatoire avec le kit de marquage Megaprime (Amersham GE Healthcare, Orsay, France) en présence de $\alpha^{32}\text{P}$ -deoxy-CTP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer, Cambridge, UK). Les nucléotides non-incorporés sont éliminés avec le kit QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

D. Analyse par Northern-blot

Une quantité équivalente d'ARN total pour chaque échantillon (20 à 40 μg) est dénaturée à 65 °C pendant 15 min dans un tampon de dénaturation (20mM MOPS (acide 3-morpholinopropane-sulfonique) ; 6,5 % formaldéhyde, 50 % formamide déionisée). Les ARN sont déposés sur un gel de migration d'agarose (1,2% agarose, 20 mM MOPS ; 0,37 M formaldéhyde) en présence de bleu de charge. Après migration (4 heures à 100 volt dans 20 mM

MOPS), les ARN sont transférés, toute la nuit, par capillarité dans du tampon 20X SSC (salin citrate standard ; 1X SSC : 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium, pH 7,0) sur une membrane de nylon (Hybond). Ensuite, les ARN sont fixés à la membrane par une exposition aux UV pendant 40 secondes puis la membrane est colorée avec une solution de bleu de méthylène à 5% d'acide acétique ; La membrane colorée est lavée avec une solution à 5% d'acide acétique puis elle est rincée à l'eau stérile. La membrane est incubée 1 heure à 65°C dans du tampon de pré-hybridation (0,25 M phosphate de sodium pH 6,8 ; 7% SDS ; 10 mg/mL BSA fraction V ; 1 mM EDTA) puis elle est incubée à 65°C toute la nuit dans du tampon de pré-hybridation en présence de la sonde ($1,5 \times 10^6$ CPM/ mL de tampon).

Après l'hybridation, les membranes sont lavées 3 fois en présence de 0,1% de SDS dans un tampon 2X SSC pendant 15 min à température ambiante, puis 2 fois en présence de 0,1% de SDS dans un tampon 0,1X SSC pendant 30 min à 65°C.

Les membranes sont placées dans des cassettes avec écran intensificateur avec un film autoradiographique (Hyperfilm, Amersham) et les cassettes sont placées à -80°C pendant 1 à 2 jours. La quantification de la radioactivité est mesurée à l'InstantImager.

Les taux d'ARNm d'IL-6 sont exprimés en fonction de la visualisation de l'ARNr 18S par fixation du bleu de méthylène sur la membrane ou bien par le décrochage de la sonde IL6 suivie par une hybridation de la membrane avec une sonde pour la déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH) de rat. Ainsi, la membrane est déshybridée pendant 1 heure à 65°C dans un tampon 10 mM phosphate de sodium contenant 50 % de formamide. Puis elle est lavée à température ambiante pendant 15 min dans une solution 2X SSC à 0,1% SDS.

E. Analyse par Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1. Reverse transcription :

La RT est effectuée avec 2 µg d'ARN total (ARN) en utilisant le kit commercial de synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) (First-Strand cDNA Synthesis Kit ; GE Healthcare). Les ARN sont dénaturés 10 min à 65°C puis ils sont incubés 1 heure à 37°C dans un volume total de réaction de 15 µL contenant 1X Bulk first-strand reaction mix ; 13,33 mM DTT ; 13,33 ng/µL de pd(N)₆ primer. Après la réaction, les échantillons d'ADNc, sont dilués au centième dans de l'eau RNase/ DNase Free (Gibco) puis ils sont conservés à -20°C.

2. Polymerase Chain Reaction

Pour quantifier le taux d'ADNc d'un gène donné, nous avons utilisé la PCR en temps réel avec la technologie SYBR Green. Le SYBR Green est un composé organique aromatique pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléiques doubles brins. Il permet de quantifier les acides nucléiques en solution car il n'interfère pas avec la réaction de PCR. Il est le principal marqueur utilisé en PCR en temps réel.

Les amorces utilisées pour l'amplification des l'ADNc sont les suivantes :

IL-6 de rat (NM_012589) :

- . sens 5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3'
- . antisens 5'-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'

Cyclophiline A (NM_017101) :

- . sens 5'-GAGCACTGGGGAGAAAGGAT-3'
- . antisens 5'-CTTGCCATCCAGCCACTCAG-3'

NIS (U60282) :

- . sens 5'-CGGATCAACCTGATGGACTT-3'
- . antisens 5'-AGTTTGGCCTTCCCTCTGT-3'

La réaction de PCR est préparée avec 5 ng d'ADNc avec le kit LightCycler ® DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) dans un volume final de 10µL qui contient 1X concentrated reaction mix SYBR Green I dye ; 3 mM MgCl₂ ; 0,5 mM d'amorce spécifique pour l'ADNc que l'on veut quantifier. La réaction de PCR est effectuée dans un thermocycleur LightCycler (Roche Applied Science). Cet appareil mesure en temps réel l'incorporation de SYBR Green dans les amplicons à chaque cycle. Ainsi, il calcule un nombre de cycle (Ct) donné ou le seuil de détection du SYBR Green incorporé est atteint. Ainsi, pour calculer le taux (R) d'un ADNc donné présent dans un échantillon stimulé par rapport à un échantillon contrôle, on utilise le calcul de Δ de Ct : $R = 2^{Ct(\text{contrôle}) - Ct(\text{stimulé})}$.

On considère que l'efficacité de PCR (E) est ici de 100%, ce qui correspond à 2 copies par cycle. Ainsi, pour chaque réaction de PCR, une gamme-étalon (0,31-10 ng) est effectuée

en interne. Celle-ci permet de calculer E. Pour l'ensemble des réactions de PCR que nous avons réalisées, E était compris entre 89 et 98%.

V. PLASMIDES ET AMPLIFICATION PAR TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

Le promoteur humain de l'IL-6, situé en amont du gène rapporteur luciférase et qui contient les nucléotides -1168 à +1 (p1168), a été cloné dans le plasmide pGL3 (pGL3-Basic, Promega Corp., Madison, USA). Le plasmide p1168, le plasmide p1168-mCRE (le site CRE du promoteur de l'IL-6 est muté) et le plasmide p1168-mC/EBP (le site du promoteur de l'IL-6 qui lie les facteurs de transcription C/EBP est muté) ont été fournis par le Pr G. Haegeman (Gent, Belgium) (Vanden Berghe et coll., 1998). Le plasmide p1168-mNFkB (le site NFkB du promoteur de l'IL-6 est muté) est un don du Dr J. Pierre (INSERM U749). Le plasmide pREP4-βGal avait été construit au laboratoire. Le plasmide p(NFkB)₆-luc qui contient 3 copies d'un oligonucléotide de la région amplificatrice du promoteur du HIV (5'-ACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGA-3') est un don du Dr P.A. Baeuerle (Munich, Allemagne). Le plasmide p(CRE)₄-luc, qui contient 4 copies d'un oligonucléotide contenant le site CRE (AGCCTGACGTCAGAG) a été commandé chez Stratagene.

La construction du plasmide pGL3-p.IL-6(1168) délété du site AP-1 (p1168-ΔAP-1) a été réalisée par mutagenèse dirigée à partir du plasmide pGL3-p.IL-6(1168). La région cible à muter (en minuscules) est :

5'-GACATGCCAAAGT**Gctgagtcact**AATAAAAGAAAAAAGAAAGTAAAGG-3'.

La suppression du site AP-1 dans le vecteur p1168 a été effectuée par la méthode QuikChange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene (La Jolla, CA) en utilisant 1 couple d'amorces :

- . sens : 5'-GACATGCCAAAGTGAATAAAAGAAAAAAGAAAGTAAAGG-3'
- . antisens : 5'-CCTTTACTTTCTTTTTTTCTTTTATTCACTTTGGCATGTC-3'

Après digestion des produits d'amplification par l'enzyme de restriction Dpn1, la présence de la mutation de délétion dans le vecteur muté a été vérifiée par PCR en utilisant le couple d'amorce suivant :

- . sens : 5'-CAAGACATGCCAAAGTG**AAT**-3'
- . antisens : 5'-GCATACGACGATTCTGTGAT-3'

Pour le primer sens, les 3 nucléotides en 3' (en gras et soulignés) se trouvent en 3' de la délétion du site AP-1 alors que les autres nucléotides se trouvent en 5' de cette délétion.

Après ligation (kit Fast-Link, TEBU) ou non des vecteurs mutés, des bactéries sont transformées (Cf. ci-après). Après amplification bactérienne et purification des plasmides, la présence des vecteurs mutés est détectée par PCR (comme précédemment) ou par analyse des fragments de restriction en utilisant les enzymes NcoI et PstI.

Le plasmide p(AP-1) 6x-Luc (p(AP-1)₆) a été construit en insérant, par ligation, un oligonucléotide double-brin synthétique, comportant 6 sites consensus AP-1 (TGACTAA) contigus encadrés par un site HindIII et un site XhoI, en amont d'un gène rapporteur luciférase dans le plasmide pLuc-MCS (Stratagene) linéarisé avec les mêmes enzymes de restriction. L'oligonucléotide double brin a été obtenu en hybridant les deux oligonucléotides suivants par chauffage à 95°C pendant 5min puis en refroidissant jusqu'à 25 °C en 50 min :

. sens :

5'-AGCTGACTAATGACTAATGACTAATGACTAATGACTAA-TGACTAA-3'

. antisens :

5'-TCGATTAGTCATTAGTCATTAGTCATTAGTCATTAGTC-3'

La vérification des plasmides recombinants a été effectuée par PCR avec l'oligonucléotide sens et le primer de séquençage pLUC-MCSseq (5'-GCTCTCCAGCGGTTCCATC-3').

Les plasmides ont été introduits dans des bactéries compétentes E. coli TOP 10 (Invitrogen) par choc thermique. La sélection des colonies transformées a été effectuée sur boîtes de pétri LB-Agar (Luria-Bertani (SIGMA) : 10 g/l tryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 10 g/l de chlorure de sodium, pH 7) contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Invitrogen) ; Agar 15g/L (Eurobio). Les colonies transformées ont poussé en suspension à 37°C sous agitation pendant la nuit dans du milieu de LB en présence d'ampicilline. Les suspensions bactériennes centrifugées ont été purifiées avec le kit Endofree Plasmid Maxi (Qiagen). L'ADN élué a été précipité avec 0,7 volumes d'isopropanol et centrifugé à 15 000 g pendant 30 min à 4°C. Les culots d'ADN séchés au dessiccateur ont été repris dans de l'eau. La concentration d'ADN plasmidique purifiée a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm et en utilisant la relation une unité de DO_{260nm} équivaut à une concentration d'ADN de 50 µg/ml.

Toutes les constructions ont été séquencées (MWG-Biotech, Ebersberg, Allemagne) pour vérification.

VI. DOSAGE DES CONCENTRATIONS PROTÉIQUES

A. Dosage Bradford

Le dosage selon la méthode de Bradford est une technique simple et rapide.

Le réactif est préparé en ajoutant 100 mg de Brilliant Blue G 250 (Coomassie® brilliant blue G 250, B0770, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'acide orthophosphorique à 85% dans un bécher. Le bécher est placé sous agitation toute la nuit et le lendemain, la solution est diluée dans un volume final de 1 L puis elle est filtrée (papier filtre standard).

Une gamme étalon de 1 à 12,5 µg est réalisée à partir d'une solution mère d'albumine bovine sérique (BSA, Pierce). Dans des tubes à hémolyses, 5 µL de lysat cellulaire sont déposés en triplicatas complétés à 100 µL avec de l'eau. 1 mL de solution de Bradford est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont incubés 2 min à température ambiante. La lecture de la densité optique au spectrophotomètre (Eppendorf) est effectuée à 595 nm.

Les valeurs de densité optique sont rapportées à la droite étalon afin de connaître la concentration protéique de chaque échantillon.

B. Dosage BCA

Cette méthode permet de mesurer des concentrations protéiques en présence de détergents (comme les extraits HNTG). Cette méthode est similaire à la réaction de Biuret qui est basée sur l'interaction de 2 molécules d'acide bicinchoninique (BCA) avec l'ion Cu^{2+} (Smith et coll., 1985). Dans un premier temps, les protéines réagissent avec l'ion Cu^{2+} pour former des ions Cu^+ qui, dans un second temps, réagissent avec 2 molécules de BCA pour former un composé qui colore la solution en violet de façon proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon dosé.

Une gamme étalon de 2 à 20 µg est réalisée à partir d'une solution mère d'albumine bovine sérique (BSA, Pierce). Dans des tubes à hémolyse, 3 à 25 µL de lysat cellulaire (le volume étant fonction du type d'extraits cellulaires réalisés) sont dilués avec de l'eau à 100 µL. Une solution de BCA est préparée extemporanément (1 volume CuSO_4 / 50 volumes BCA) et 1 mL est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont incubés 15 min à 60°C puis ils sont laissés à température ambiante quelques minutes avant d'effectuer la lecture. La lecture de la densité optique au spectrophotomètre est faite à 562nm (Eppendorf).

Les valeurs de densité optique sont rapportées à la droite étalon afin de connaître la concentration protéique de chaque lysat cellulaire.

VII. MESURE DE L'INCORPORATION DE ³H-THYMIDINE

Les cellules FRTL-5 sontensemencées dans des plaques de 12 puits (TPP) à une densité de 10⁵ cellules par puits dans du milieu complet de culture. Les cellules sont incubées 24 à 48 h puis sont déprivées pendant 48h. Avant chaque stimulation, le milieu de déprivation est changé. Les cellules sont stimulées puis 2 µCi/mL de ³H-thymidine (methyl-³H ; 20 Ci/mmol ; Perkin Elmer) en présence de 1mM de thymidine froide sont ajoutés 3h avant la fin de la stimulation.

L'incorporation de thymidine est arrêtée en rinçant 2 fois les puits avec du PBS froid. Les protéines sont précipitées pendant 30 min à 4°C dans 1 mL de TCA 5% glacé et fraîchement préparé. Le surnageant est éliminé et 300 µL de tampon de lyse (0,02N NaOH ; 1% SDS) sont ajoutés. Les plaques sont incubées 30 min à température ambiante. Le lysat est récupéré et la détermination de la radioactivité incorporée se fait par comptage de 250 µL de lysat dans 5 mL d'UltimaGold XR (Packard) pendant 10 min au compteur à scintillation.

VIII. MESURE DE L'INCORPORATION DE ³H-LEUCINE

Les cardiomyocytes de rats adultes sontensemencées dans des plaques de 6 puits (TPP) tapissées de laminine (1mg/mL) à une densité de 1,5x10⁵ cellules par puits dans du milieu complet de culture. Les cellules sont déprivées en sérum pendant 24h. Avant chaque stimulation, le milieu de déprivation est changé. Les cellules sont stimulées puis 2 µCi/mL de ³H-leucine (L-(4,5-³H)leucine ; 120-190 Ci/mmol ;GE Healthcare ; TRK510) sont ajoutés dans chaque puits 4h avant la fin de la stimulation. L'incorporation est arrêtée en rinçant 2 fois les puits avec du PBS froid. Les protéines sont précipitées à 4°C la nuit dans 1 mL de TCA 5% glacé et fraîchement préparé. Le surnageant est éliminé et les puits sont rincés avec 1mL de TCA 5%. 1 mL de tampon de lyse (0,1 % Triton X100 ; 0,02 N NaOH) est ensuite ajouté et les plaques sont incubées pendant 1 heure à température ambiante. Le lysat est récupéré et la détermination de la radioactivité incorporée se fait par comptage de 500 µL de lysat dans 5 mL d'UltimaGold XR pendant 10 min au compteur à scintillation.

Pour normaliser chaque point de mesure, le contenu en ADN pour chaque échantillon est quantifié par incorporation de PicoGreen (Quant-iT PicoGreen ; Invitrogen). 20 µL d'échantillon en triplicat sont incubés pendant 10 min à température ambiante en présence de

100 μ L de PicoGreen dilué au 1/200 dans du tampon Tris-EDTA. La mesure de fluorescence est effectuée sur une plaque de 96 puits dans le lecteur Envision Xcite (Perkin Elmer) en excitant à 480 nm et en mesurant à 520 nm,. Les intensités de fluorescence sont rapportées à une gamme d'ADN (50-1000 ng/mL) de sperme de saumon (Roche).

IX. DOSAGE ELISA

L'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) en sandwich est, littéralement, un dosage d'immunosorption liée à l'enzyme qui est un dosage immunoenzymatique sur support solide (une plaque de 96 puits). Nous avons utilisé cette technique de dosage pour la détermination du taux de molécules (hormone, cytokine) sécrétées dans le milieu de culture.

A. Dosage de l'IL-6 sécrétée

Après stimulation des cellules (2×10^6 cellules FRTL-5 ou 2×10^5 cardiomyocytes), les milieux de culture conditionnés sont prélevés et sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants sont prélevés puis ils sont aliquotés et sont conservés à -80°C.

Le jour du dosage ELISA, les échantillons sont décongelés à température ambiante et ils sont homogénéisés. 50 μ L d'échantillon sont dosés en double en utilisant le kit commercial de dosage ELISA IL-6 de rat (ER2IL6 ; Pierce Biotechnology, Inc.). Les échantillons sont incubés sur une plaque (fournie dans le kit) de 96 puits, tapissés d'un anticorps anti-IL-6, pendant 2 heures à une température de 20 à 25°C. La plaque est lavée 3 fois avec du tampon de lavage du kit. 100 μ L d'anticorps biotinylé du kit sont disposés dans chaque puits. La plaque est incubée 1 heure à température ambiante. La plaque est lavée 3 fois avec du tampon de lavage et 100 μ L d'une solution de streptavidine-HRP (peroxydase du raifort) du kit (préparée extemporanément) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante puis elle est lavée 3 fois avec du tampon de lavage.

La révélation est réalisée en incubant 100 μ L de substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) du kit dans chaque puits pendant 15 à 30 min à température ambiante. Ce chromogène a une couleur bleu lorsqu'il est oxydé par le peroxyde

d'hydrogène (cette réaction étant catalysée par l'enzyme HRP). La réaction de révélation est arrêtée en ajoutant 100 µL de solution STOP du kit. La couleur du TMB devient jaune lorsque l'on ajoute de l'acide phosphorique qui est présent dans la solution STOP. L'absorbance est lue sur un lecteur spectrophotomètre de plaque (BenchMark Plus ; Biorad) à 450 nm et à 550 nm. Les valeurs obtenues à 550 nm sont retranchées de celles obtenues à 450 nm afin de corriger les imperfections optiques de la plaque.

Les résultats sont exprimés en fonction d'une gamme-étalon (250 à 2000 pg/mL) d'IL-6 de rat (fournie dans le kit) qui est préparée extemporanément et qui dosée (en suivant le même protocole que pour les échantillons) en interne lors de chaque ELISA.

B. Dosage du BNP sécrété

Après stimulation des cardiomyocytes (2×10^5 cellules par boîte), les milieux de culture conditionnés sont prélevés et des inhibiteurs de protéases sont ajoutés, puis ils sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants sont prélevés, sont aliquotés et sont conservés à -80°C.

Le jour du dosage ELISA, les échantillons sont décongelés à température ambiante et ils sont homogénéisés. 50 µL d'échantillon sont dosés en double en utilisant le kit commercial de dosage ELISA BNP de rat (AssayMax Rat-45 ELISA Kit, ERB1202-1, ASSAYPRO). Les échantillons sont incubés sur une plaque (fournie dans le kit) de 96 puits, tapissés d'un anticorps anti-BNP, pendant 2 heures à une température de 20 à 25°C. Puis, la plaque est incubée à 4°C toute la nuit. La plaque est lavée cinq fois avec du tampon de lavage du kit. 50 µL d'anticorps biotinylé du kit sont disposés dans chaque puits. La plaque est incubée 1 heure à température ambiante. La plaque est lavée cinq fois avec du tampon de lavage et 50 µL d'une solution de streptavidine-HRP du kit (préparée extemporanément) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante puis elle est lavée cinq fois avec du tampon de lavage. La révélation est réalisée en incubant 50 µL de substrat TMB du kit dans chaque puits pendant 30 min à température ambiante. La réaction de révélation est arrêtée en ajoutant 50 µL de solution STOP du kit. L'absorbance est lue sur un lecteur spectrophotomètre de plaque (BenchMark Plus ; Biorad) à 450 nm et à 550 nm. Les valeurs obtenues à 550 nm sont retranchées de celles obtenues à 450 nm afin de corriger les imperfections optiques de la plaque.

Les résultats sont exprimés en fonction d'une gamme-étalon (125 à 1000 pg/mL) de BNP de rat (fournie dans le kit) qui est préparée extemporanément et qui dosée (en suivant le même protocole que pour les échantillons) en interne lors de chaque ELISA.

X. ANALYSE PAR WESTERN-BLOT

Les extraits protéiques, en quantité équivalente pour chaque échantillon, ont été dénaturés dans un tampon de Laemmli (0,1% bleu de bromophénol, 30 mM Tris pH 6.8, 2.5% β -mercaptoéthanol, 1% SDS, 10% glycérol) par chauffage pendant 5 min à 100°C et ils ont été déposés sur des gels pré-coulés avec différents gradients d'acrylamide (4-12% ou 8-16%) saturés en SDS (Lonza) et ils ont été soumis à une électrophorèse à 130 volts dans un tampon de migration (25mM Tris, 200mM glycine, 0.1% SDS, Invitrogen).

Après la séparation sur gel, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (pores de 0,2 μ m, BA83, Whatman, GmbH, Dassel, Allemagne) en présence d'un tampon de transfert (0.192 M glycine, 0.025 M Tris pH 8.3 (Invitrogen), 20% méthanol) pendant 2 heures à ampérage constant (120 mA). Après le transfert, pour vérifier la quantité de protéines chargée dans chaque puits ainsi que la qualité du transfert, la membrane est colorée avec du rouge Ponceau S (B6008, SIGMA) dissout dans 3% d'acide trichloroacétique. La membrane est saturée avec 3% d'albumine sérique bovine (BSA protease free, PAA) dissous dans du tampon de lavage TBS-Tween (50mM tampon Tris pH 7,4 ; 0,15M NaCl ; 0,1% Tween 20) pour les protéines phosphorylées ou avec 5 % de lait écrémé dissous dans du tampon de lavage PBS-Tween (20mM tampon phosphate pH 7,4 ; 0,15M NaCl ; 0,1% Tween 20). La membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec les dilutions appropriées des différents anticorps primaires. La membrane est lavée plusieurs fois avec du tampon de lavage avant d'être incubée 1 heure et demi à température ambiante avec un anticorps secondaire approprié (en fonction de l'espèce de l'anticorps primaire) qui est couplé à la HRP. La membrane est lavée plusieurs fois avec du tampon de lavage puis les bandes protéiques immunoréactives sont révélées par détection amplifiée de chimiluminescence (WestPico, WestFemto, Perbio Science, Vigneux, France) et sont visualisées sur film autoradiographique (BioMax Film, Kodak).

XI. TRANSFECTION TRANSITOIRE ET DOSAGES DES ACTIVITÉS LUCIFÉRASE ET BÉTA-GALACTOSIDASE

Les cellules FRTL-5 ont été ensemencées à environ 70% de confluence dans des plaques de 6 puits. 24 heures plus tard, les transfections transitoires ont été effectuées avec le réactif

de transfection FuGENE 6 (Roche) avec un rapport réactif/ADN de 3/1. Le FuGENE 6 est un mélange de lipides dont les charges positives interagissent spontanément avec les charges négatives des acides nucléiques. Le complexe ADN-FuGENE ainsi formé interagit avec les membranes cellulaires, conduisant à la libération des plasmides dans le cytoplasme. Ces séquences exogènes seront transportées ultérieurement vers le noyau afin de permettre leur expression.

Dans chaque transfection, des quantités variables des divers plasmides ont été ajoutées, en même temps que 100 ng du plasmide pREP4- β Gal. Les cellules ont été incubées pendant 24h puis elles ont été déprivées (milieu F12 modifié par Coon sans hormone et sans sérum) pendant 24h supplémentaires. Les activités luciférase et β -galactosidase ont été ensuite déterminées en utilisant les systèmes de dosage d'activité (Roche) en se rapportant aux instructions fournies par le fabricant. Les activités luciférase et les activités β -galactosidase correspondantes ont été mesurées avec le luminomètre TD-20/20 (Turner Designs). Pour chaque point, l'activité luciférase mesurée a été normalisée par rapport à l'activité β -galactosidase correspondante. Les expériences ont été répétées plusieurs fois et les moyennes obtenues ont été comparées par le test de Student Fischer. Les différences ont été considérées comme significatives pour toute valeur de « p » inférieure ou égale à 0,05.

XII. EMSA

L'EMSA (electrophoretic mobility shift assay) est une technique *in vitro* qui permet d'étudier les interactions ADN-protéines en appliquant le principe que la migration du complexe ADN-protéines est retardée sur gel (« shift ») par rapport à celle de l'ADN seul. Les EMSA ont été réalisés en utilisant des oligonucléotides double-brins qui correspondent à un site de liaison consensus pour AP-1 ou pour un site CRE :

- AP1 : . sens : 5'-AAGTGCTGAGTCACTAATAA-3'
- . antisens : 5'-TTATTAGTACTCAGCACTTT-3'
- CRE : . sens : 5'-GCTAAAGGACGTCACCTTAAT-3'
- . antisens : 5'-ATTAAGGTGACGTCCTTTAGC-3'

Les oligonucléotides ont été marqués au niveau de leurs extrémités 5' avec la polynucléotide kinase T4 (Invitrogen) en présence de γ^{32} P-ATP (300 Ci/mmol ; Perkin Elmer). Ensuite, ils ont été purifiés par la technique de précipitation à l'éthanol.

Des aliquots d'extraits nucléaires (3 µg de protéines) ont été incubés avec 0,25 ng d'oligonucléotides radiomarqués dans un tampon contenant 20 mM HEPES pH 7,9 ; 2,5 mM MgCl₂ ; 3 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 10% glycérol ; 50 µM acide okadaïque ; 1mM Na₃VO₄ ; 1 mM AEBSF ; 1 µg poly(dI-dC) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Cf. table) dans un volume total de 15 µL. Les réactions de liaison ADN-protéines sont effectuées pendant 30 min à température ambiante.

La spécificité de liaison a été déterminée en ajoutant un excès de 200 fois d'oligonucléotides non-marqués par rapport à la sonde oligonucléotidique.

Les complexes d'ADN-protéines ont été analysés sur un gel à 6% de polyacrylamide en condition non dénaturante (Invitrogen) qui a migré à 150V pendant 2h en chambre froide.

Dans les expériences de « supershift », les extraits nucléaires ont été pré-incubés pendant 60 min à température ambiante avec 1 µg d'anticorps spécifique d'un facteur de transcription donné ou avec 1 µg d'immunoglobuline G non-immunes (servant de contrôle).

Après migration, les gels sont fixés dans un tampon 20% méthanol ; 10% acide acétique. L'incorporation de la radioactivité (³²P) est révélée puis quantifiée avec un Instant Imager (Packard).

RÉSULTATS

A. Introduction

La glande thyroïde est un organe où l'on observe très fréquemment des maladies auto-immunes telles que la maladie de Basedow et la thyroïdite d'Hashimoto. Lors de ces maladies auto-immunes thyroïdiennes, la production de cytokines pro-inflammatoires est élevée. Ces cytokines comme l'IL-6, sont libérées par l'infiltrat lymphocytaire mais aussi par les thyrocytes eux-mêmes.

La glande thyroïde est sous le contrôle hormonal de la TSH, qui conduit à l'activation de la voie de l'AMPc. Lors des maladies auto-immunes de la thyroïde, les taux de TSH (thyroïdite d'Hashimoto) ou les taux d'anticorps TSAAb (maladie de Basedow) sont élevés. Le rôle de la TSH ou de l'AMPc dans les maladies auto-immunes thyroïdiennes reste à clarifier. En effet, la TSH ou l'AMPc, par leur action sur la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, pourrait conduire à l'établissement et/ou la progression des maladies auto-immunes.

Nous avons donc recherché dans la lignée de cellules thyroïdiennes FRTL-5, si l'AMPc pouvait avoir un rôle régulateur dans l'induction de l'expression de l'IL-6 par une autre cytokine, l'IL-1, et quels étaient alors les mécanismes moléculaires impliqués non seulement au niveau protéique mais aussi au niveau de l'expression de l'ARN messager.

L'IL-6 est une cytokine aux effets multiples, qui exerce ses effets en activant un complexe constitué de deux récepteurs à l'IL-6 et de deux gp130 ce qui permet la transmission du signal. Deux voies majeures de signalisation sont activées par l'IL-6 : la voie JAK/STAT et la voie SHP2/PI3K/MAPK. Dans le thyrocyte, les données concernant les voies de signalisation activées par l'IL-6 et les effets de l'IL-6 ne sont pas clairement établies. Nous avons donc étudié l'effet de l'IL-6 sur l'activation des voies de signalisation et évaluer les effets l'IL-6 au niveau de l'expression d'un gène de différenciation, le NIS, et au niveau de la stimulation de la prolifération.

B. Résumé des résultats publiés

Dans ce travail, nous avons montré que le traitement des cellules FRTL-5 par l'IL-1 en combinaison avec l'AMPC (FSK) induit une sécrétion importante d'IL-6 (15 ng/2x 10⁶ cellules). Cet effet est synergique et il est reproduit au niveau de l'expression de l'ARNm de l'IL-6, mesurée par Northern blot. Après 1 heure de stimulation, l'expression de l'ARNm de l'IL-6 induite par l'IL-1 est augmentée de plus de 3 fois en présence de FSK. Ce mécanisme est dépendant de la PKA mais pas du facteur d'échange Epac.

Par des expériences de Northern blot, nous avons montré, pour la première fois, que la voie AMPC induit une stabilisation de l'ARNm de l'IL-6.

Nous avons recherché si l'effet synergique IL-1/FSK s'exerçait à un niveau transcriptionnel. Le promoteur humain de l'IL-6 a été transfecté transitoirement dans les cellules FRTL-5. Après 7 heures de stimulation, l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6 est stimulée 10 fois par l'IL-1 et 40 fois en présence d'IL-1/FSK, alors que la FSK seule n'a pratiquement pas d'effet (1,9 fois).

Le prétraitement des cellules transfectées avec un inhibiteur de la PKA, le H89, induit une réduction de 65% de l'effet synergique de l'IL-1/FSK, suggérant une implication de la PKA.

Nous avons cherché les éléments régulateurs du promoteur du gène de l'IL-6 qui sont impliqués dans l'effet synergique de l'IL-1/FSK. Pour cela, nous avons utilisé des constructions sauvages, mutées ou délétées sur les principaux sites de liaison des facteurs de transcription du promoteur du gène de l'IL-6. Le traitement par IL-1/FSK stimule de 20 fois l'activité du promoteur sauvage. La délétion du site AP-1 entraîne une abolition de la synergie et l'activité du promoteur retourne au niveau de celle stimulée par l'IL-1 seule (5 fois). Un résultat similaire est obtenu si le site CRE est muté. Par contre, bien que la mutation du site NF-κB diminue considérablement l'effet de l'IL-1 (1,3 fois), l'effet synergique de la FSK est significativement conservé.

Les sites AP-1 et CRE du promoteur de l'IL-6 étant impliqués dans le mécanisme synergique de l'IL-1/FSK au niveau de l'activité transcriptionnelle du promoteur, nous avons étudié, par des expériences de retard sur gel, la liaison *in vitro* des facteurs de transcription de la famille AP-1 et ceux de la famille CREB sur des sondes AP-1 et CRE. L'incubation d'extraits nucléaires de cellules FRTL-5 traités par l'IL-1 et la FSK avec les différentes sondes indiquent que la liaison de la sonde AP-1 est augmentée de 2,7 fois par l'IL-1 en

présence de FSK alors qu'elle est augmentée de 1,9 fois par l'IL-1 seule. L'incubation des extraits nucléaires de cellules FRTL-5, traitées ou non, avec la sonde CRE ne révèle aucun changement dans la liaison.

Afin d'identifier les facteurs de transcription responsables de l'augmentation de la liaison sur la sonde AP-1, nous avons pré-incubé les extraits nucléaires des cellules FRTL-5 avec des anticorps dirigés contre plusieurs membres de la famille des facteurs de transcription AP-1. Les anticorps dirigés contre c-Jun, JunB et JunD et contre c-Fos, Fra2 et FosB induisent une diminution de la liaison sur la sonde AP-1. L'augmentation de la liaison sur la sonde est donc dépendante de l'enrichissement des extraits nucléaires en facteurs de transcription AP-1 en réponse à la stimulation IL-1/FSK.

Par Western-blot, nous avons montré que l'expression de c-Fos est induite par l'IL-1 et que cette induction est augmentée par la FSK et, que l'expression de Fra2 est induite uniquement par l'IL-1 en association avec la FSK.

Les résultats obtenus par la technique de retard sur gel et ceux obtenus par Western-blot suggèrent que l'effet synergique IL-1/FSK sur la liaison du site AP-1 est probablement due à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription c-Fos et Fra2

C. Résultats non-publiés

1. Activation des voies de signalisation par l'IL-6

Dans l'équipe, il a été mis en évidence, par RT-PCR, que les cellules FRTL-5 que nous utilisons expriment l'ARNm du IL-6R (gp80) (donnée non-montrée). Ce résultat suggère que le IL-6R peut être exprimé à la membrane des cellules FRTL-5.

Nous avons donc étudié l'activation des voies de signalisation dans les cellules FRTL-5 en incubant, en fonction du temps (10 à 60 minutes), les cellules en présence de 100 ng/mL d'IL-6 recombinant de rat (rIL-6).

Par des expériences de Western-blot, en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre la phosphotyrosine 705 de STAT3 (p-STAT3 Y⁷⁰⁵), nous avons montré que l'rIL-6 induit dès 10 min la phosphorylation de STAT3. Cet effet est maximal à 20 minutes et il est maintenu jusqu'à 60 minutes (figure 24).

Nous avons aussi regardé les autres voies qui pourraient être stimulées en réponse à l'IL-6. Nous avons regardé la phosphorylation de Akt et des ERK1/2. En réponse à l'IL-6, nous n'avons pas observé d'effet.

Le LIF a été décrit comme stimulant la voie de signalisation MEK5/ERK-5. Nous avons donc étudié par Western-blot la phosphorylation de ERK-5 en réponse à l'IL-6. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la MAPK ERK-5 sur les résidus thréonine 218 et tyrosine 220 (p-ERK5 T²¹⁸-Y²²⁰), permet de mettre en évidence que l'IL-6 induit l'activation de ERK-5 dès 20 minutes. Cette activation est maintenue jusqu'à 60 minutes (figure 24).

Ces données indiquent que l'IL-6 stimule la voie JAK/STAT3 ainsi que la voie conduisant à l'activation de la MAPK ERK-5.

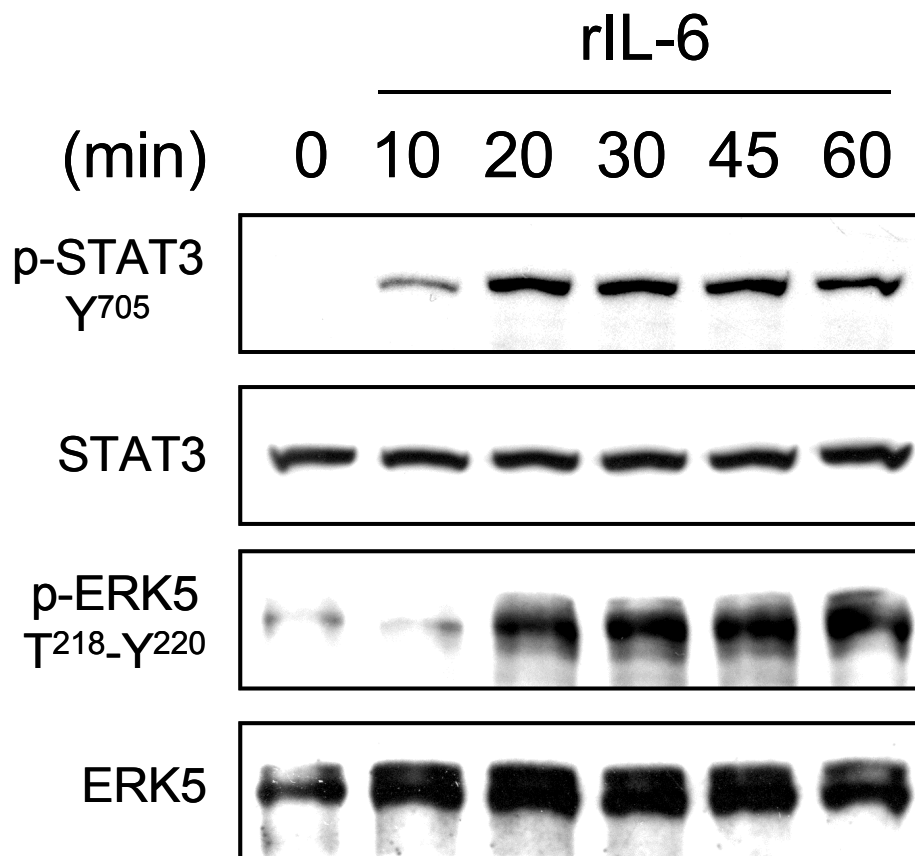


Figure 24 : Après incubation en fonction du temps avec 100 ng/mL de rIL-6, les cellules FRTL-5 sont lysées dans un tampon β -glycérophosphate. Les extraits obtenus sont analysés par Western-blot. La phosphorylation de STAT3 et de ERK-5 sont étudiées par l'utilisation d'anticorps spécifique pour p-STAT3Y⁷⁰⁵ et pour p-ERK5 T²¹⁸-Y²²⁰. Les bandes immuno-réactives sont révélées par chemiluminescence avec un anticorps couplé à l'enzyme HRP. La charge en protéine est contrôlée en utilisant des anticorps spécifiques pour STAT3 et ERK5.

2. Effet de l'IL-6 sur l'expression de l'ARNm du NIS stimulée par FSK

Comme la TSH stimule l'expression de l'ARNm du transporteur de l'iodure (NIS) et que cet effet est reproduit par la FSK (Kogai et coll., 1997), nous avons donc examiné l'effet de l'IL-6 sur l'expression de l'ARNm du NIS stimulée par la FSK par RT-PCR en temps réel.

Alors que l'IL-6 seul n'a pas d'effet significatif sur l'expression de l'ARNm du NIS (0,9 fois +/- 0,08), la FSK seule induit fortement l'expression de l'ARNm du NIS (stimulation de 73,9 fois +/- 9,5) (figure 25). En présence d'IL-6, l'effet stimulateur de la FSK est diminué de 30% (stimulation de 50,2 fois +/- 1,89) (figure 25).

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de l'IL-6 sur l'activité transcriptionnelle du promoteur du NIS, qui a été transfecté de façon transitoire dans les cellules FRTL-5. L'IL-6 seule ou en présence de FSK, n'a pas d'effet sur l'activité basale du promoteur, ni sur son induction stimulée par la FSK (données non-montrées).

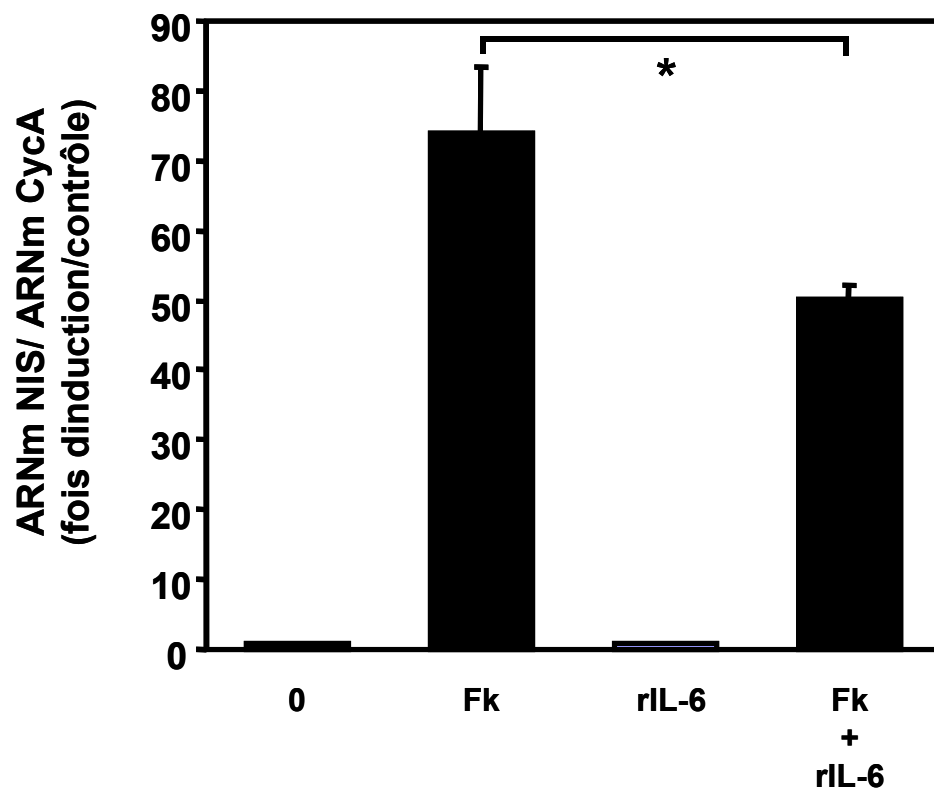


Figure 25 : Les cellules FRTL-5 sont incubées en présence ou non, avec Fk (10 μ M), rIL-6 (100ng/mL) seules ou en association pendant 24h. Les cellules sont récoltées et les ARN totaux sont extraits puis sont analysés par RT-PCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques pour l'ARNm du NIS et spécifiques pour la CycA. Les résultats présentés sont la moyenne de 4 expériences indépendantes; (*) $p < 0,05$ (test de Student apparié).

3. Effet de l'IL-6 sur la prolifération stimulée par l'INS en association avec la FSK

Les cellules FRTL-5 sont amenées à un état quiescent, par déprivation en sérum et en hormones du milieu de culture pendant 48 heures. Elles sont ensuite incubées en présence d'INS (10µg/mL) en combinaison avec de la FSK (10µM) et en présence ou non d'IL-6 (100ng/mL) pendant différents temps.

La figure 26.A montre, comme attendu, que l'INS et la FSK stimule l'incorporation de ³H-thymidine et que cet effet est maximal à 36 heures (41651 cpm +/- 733). En présence d'IL-6, nous observons une légère inhibition (non significative) de l'incorporation de ³H-thymidine à 24 et à 36 heures (34644 cpm+ /- 3204).

A 36 heures d'incubation, la stimulation de la synthèse d'ADN par l'INS et la FSK (normalisée à 100%) atteint 83% en présence d'IL-6 (figure 26.B). L'effet de l'INS seule sur la prolifération est moins important (69%) et cet effet est diminué en présence d'IL-6 (48%).

Nous avons montré que l'IL-6 inhibe légèrement la synthèse d'ADN stimulée par l'INS et la FSK ou par l'INS seule dans les cellules FRTL-5 mais cet effet n'est pas significatif.

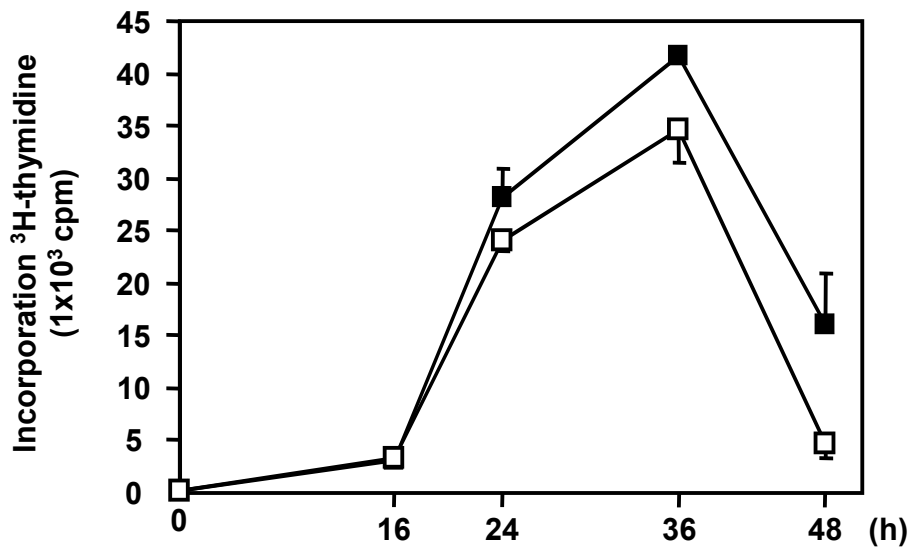
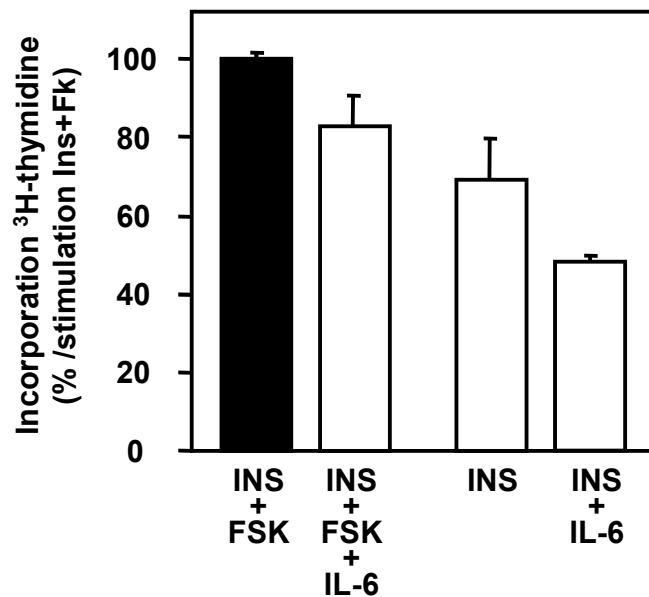
A**B**

Figure 26 : A) Les cellules FRTL-5 quiescentes sont incubées en fonction du temps avec de l'INS (10 μ g/mL) et avec de la FSK (10 μ M) en présence (carrés blancs) ou en absence d'IL-6 (100 ng/mL) (carrés noirs). B) Représentation en pourcentage de l'incorporation de ³H-thymidine à 36 heures. A) et B) 3 heures avant la fin de l'incubation, la ³H-thymidine (2 μ Ci/mL) est ajoutée au milieu de culture puis les cellules sont fixées et la ³H-thymidine incorporée est mesurée (comme décrit dans les matériels et méthodes). Les résultats sont la moyennes d'une expérience mesurée en triple +/- SEM.

D. Conclusion-discussion

Ces données indiquent qu'une coopération synergique a lieu entre la voie AMPc/PKA et les voies de signalisation activées par l'IL-1, conduisant à une stimulation importante de l'activité du promoteur de l'IL6 dans les cellules FRTL-5. Dans les cellules FRTL-5, nous avons décrit un effet synergique de l'IL-1 et de la FSK sur la sécrétion de l'IL-6 et sur l'expression du gène de l'IL-6 et nous avons identifié certains des mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet.

Nous avons montré que l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de l'IL-6 est stimulée de manière synergique par l'IL-1 en association avec la FSK. Ce mécanisme implique le site AP-1 du promoteur du gène de l'IL-6 et l'augmentation de l'expression de c-Fos et de Fra2.

Les cellules FRTL-5 possèdent des récepteurs à l'IL-6 et en réponse à l'IL-6, STAT3 et ERK5 sont phosphorylés. A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est décrit une activation de ERK5 par l'IL-6 dans les cellules FRTL-5 où dans tout autre type cellulaire.

Nous montrons que l'expression de l'ARNm du NIS, connue pour être stimulée en présence de FSK, est diminuée en présence d'IL-6. Cependant, cet effet a déjà été décrit et il a été rapporté que la fonction de la protéine NIS ne serait pas affectée (Spitzweg et coll., 1999).

Nous montrons que la synthèse d'ADN stimulée par l'INS et la FSK, semble être diminuée en présence d'IL-6. Les résultats d'une autre équipe suggèrent un effet inhibiteur de l'IL-6 sur la prolifération des thyrocytes de rats car un anticorps anti-IL-6 abolit l'inhibition de la prolifération des thyrocytes en culture primaire stimulée par les cellules dendritiques (Simons et coll., 1998). Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Nishiyama et coll. (1993). Plusieurs explications pourraient expliquer ce désaccord : nous avons utilisé la FSK alors que dans l'autre étude, la TSH a été utilisée. De plus, il existe plusieurs lignées de cellules FRTL-5 dont les réponses peuvent être différentes

ARTICLE 1

ACTIVATION OF THE CAMP PATHWAY SYNERGISTICALLY INCREASES IL-1-INDUCED IL-6 GENE EXPRESSION IN FRTL-5 THYROID CELLS: INVOLVEMENT OF AP-1 TRANSCRIPTION FACTORS

Nicolas Szabo-Fresnais, Jean-Paul Blondeau, Martine Pomérance

Molecular and Cellular Endocrinology 284 (2008) 28–37

II. PRODUCTION SYNERGIQUE DE L'IL-6 EN REPONSE A L'ISO ET L'IL-1 ET EFFET AUTOCRINE DE L'IL-6 DANS LES CARDIOMYOCYTES DE RATS ADULTES

A. Introduction

La fonction cardiaque, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, est assurée par les cardiomyocytes. Leur fonction est principalement régulée par le système neurohormonal adrénergique via la stimulation des récepteurs adrénergiques.

Une stimulation aiguë des récepteurs β -adrénergiques, est bénéfique pour la fonction cardiaque alors qu'une stimulation chronique est délétère. Il a été mis en évidence qu'une stimulation β -adrénergique chronique induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires jouent vraisemblablement un rôle significatif dans le développement de la toxicité cardiaque stimulée par les récepteurs β -adrénergiques (Murray et coll., 2000) et seraient d'importants médiateurs lorsque le cœur est soumis à un stress. De nombreux travaux montrent que l'IL-1, le TNF- α ou encore l'IL-6 sont fortement exprimés dans les zones infarctées du myocarde ainsi que dans le tissu cardiaque du cœur insuffisant (Deten et coll., 2003; Nian et coll., 2004; Ono et coll., 1998). Bien que des travaux montrent que les cytokines ont un effet inotrope négatif (Prabhu, 2004), les effets propres de ces cytokines sont encore mal connus et il a été proposé que ces cytokines puissent agir de concert avec d'autres signaux extracellulaires.

Des études cliniques ont montré que les taux circulants d'IL-6 et des membres de la famille de l'IL-6 sont significativement augmentés lors d'une insuffisance cardiaque. Ces cytokines sont impliquées dans la pathologie du cœur insuffisant (Wolwertz et Deller, 2001).

Nous avons montré, ainsi que d'autres équipes dans d'autres systèmes cellulaires, que la production d'IL-6 induite par l'IL-1 est augmentée lorsque la voie de l'AMPc est stimulée (Grassl et coll., 1999; Hersh ko et coll., 2002; Szabo-Fresnais et coll., 2008). Il était donc intéressant d'étudier les interactions qui peuvent exister entre ces cytokines et les catécholamines qui régulent la physiologie du cardiomyocyte. Nous avons donc étudié la production de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 et nous avons cherché à caractériser l'effet d'un agoniste β -adrénergique, l'ISO, ou l'effet de l'activation sélective des sous types des

récepteurs béta-adrénergiques sur cette production. Le rôle des PDE a été étudié à l'aide d'inhibiteurs spécifiques sur la sécrétion de l'IL-6 stimulée avec l'IL-1 seul ou en combinaison avec l'ISO.

L'IL-6 produite peut donc exercer diverses actions : endocrine, paracrine et/ou autocrine. Ce dernier mode d'action a été étudié. L'IL-6 pourrait agir principalement sur le myocarde par couplage avec son récepteur soluble (mécanisme de trans-signaling) et pourrait être impliqué dans le processus hypertrophique pathologique.

Nous avons donc étudié les voies de signalisation activées par l'IL-6 en présence et en absence de son récepteur soluble dans les cardiomyocytes de rat adulte. Nous avons évalué l'effet de l'IL-6 seule ou en combinaison avec son récepteur soluble sur plusieurs marqueurs connus de l'hypertrophie cardiaque.

B. Résumé des résultats soumis pour publication

1. Effet synergique de l'ISO sur la sécrétion de l'IL-6 induite par l'IL-1

Après 16h d'incubation dans un milieu sans sérum, les cardiomyocytes, sécrètent faiblement de l'IL-6 (environ 200 pg/mL de milieu de culture). L'ISO affecte légèrement cette sécrétion alors qu'elle est fortement induite par l'IL-1. L'ISO et l'IL-1 en association ont un effet synergique sur la sécrétion d'IL-6 (1,2 ng/mL).

Cette induction synergique de la sécrétion de l'IL-6 par l'IL-1/ISO implique une synthèse *de novo* d'IL-6. En effet, par des expériences de RT-PCR, nous montrons un effet synergique de l'IL-1 et de l'ISO sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans les cardiomyocytes.

L'effet de l'ISO peut impliquer les protéines hétérotrimériques Gs et Gi. Nous montrons que la toxine cholérique (CT), qui active directement la protéine Gs, a également un effet synergique avec l'IL-1 sur la production d'IL-6. Par contre, l'inhibition de la protéine Gi, ne modifie pas l'effet synergique ISO/IL-1 indiquant que l'effet synergique ne passe pas par Gi.

L'effet synergique de l'ISO sur la sécrétion de l'IL-6 induite par l'IL-1 implique la production intracellulaire d'AMPc puisque la FSK ou l'IBMX reproduisent l'effet synergique.

L'activation de la PKA est impliquée, en partie, dans cet effet synergique car son inhibition par le Rp-cAMPs réduit de manière significative l'effet synergique de l'IL-1/ISO.

Alors que, l'activation du facteur d'échange Epac, l'autre cible de l'AMPC, par le 8-CPT-2'OMe-cAMP (8-CPT-Me-cAMP) est sans effet sur la sécrétion stimulée par l'IL-1.

2. Activation des voies de signalisation et effets de l'IL-6

Par RT-PCR et par Western-blot, nous montrons que les cardiomyocytes expriment le récepteur IL-6R.

L'IL-6 de rat est capable d'activer la phosphorylation des MAPK ERK1/2 ainsi que la phosphorylation de Akt et de la P70S6K.

Alors que l'incubation des cardiomyocytes avec de l'IL-6 de rat n'active pas la phosphorylation du facteur de transcription STAT3, on observe que l'IL-6 en combinaison avec son récepteur soluble, le sIL-6R, stimule rapidement la phosphorylation de Stat3 qui est toujours présente après 6h de stimulation.

L'utilisation du « JAK inhibitor » inhibe l'activation des voies de signalisation stimulées par l'IL-6 de rat et par le complexe IL-6/sIL-6R, ce qui indique que les activations de ces voies de signalisation sont dépendantes de gp130/JAK.

Il est connu que le gène c-fos a un rôle dans l'activation de la transcription de gènes hypertrophiques. Nous avons donc étudié l'expression de l'ARNm du gène de c-fos sous l'effet d'une stimulation IL-6 ou IL-6/sIL-6R. Nous montrons que c-fos est fortement induit par IL-6/sIL-6R mais pas par l'IL-6 seule.

L'incorporation de ³H-leucine est un bon indicateur de la synthèse protéique qui permet d'évaluer l'hypertrophie cellulaire. Nous montrons que l'incorporation de ³H-leucine est augmentée significativement par l'IL-6/sIL-6R (140% de la valeur contrôle) alors que l'IL-6 seule n'a pas d'effet significatif.

Au cours de l'hypertrophie cardiaque, il existe une réexpression du programme des gènes fœtaux. Parmi eux, le BNP est connu pour être exprimé par le myocyte cardiaque au cours du processus hypertrophique. Par la technique d'ELISA, nous avons étudié la sécrétion du BNP par les cardiomyocytes. Alors que l'IL-6 seule n'a pas d'effet sur la sécrétion du BNP, celle-ci est induite de plus de 2,5 fois en présence de son récepteur soluble IL-6/sIL-6R.

Le trans-signaling de l'IL-6 est nécessaire pour l'expression des marqueurs de l'hypertrophie cellulaire dans les cardiomyocytes .

C. Résultats non-publiés

1. Etude du rôle des sous-types des récepteurs β -adrénergiques sur l'effet synergique de l'IL-1/ISO dans la sécrétion de l'IL-6.

La figure 27.A montre que la sécrétion d'IL-6 par les cardiomyocytes induite par l'IL-1 (4 fois par rapport au contrôle) est potentialisée par l'ISO (SI de 3,48 +/- 0,18). Une stimulation des récepteurs β 2-adrénergiques (en présence d'un antagoniste pour les récepteurs β 1-adrénergique, le CGP-20712A) reproduit l'effet synergique obtenu avec l'IL-1/ISO. Par contre, la pré-incubation des cardiomyocytes avec un antagoniste des récepteurs β 2 adrénergiques, l'ICI-118 551, diminue de façon significative (20%) l'effet synergique de l'IL-1/ISO (SI de 2,27 +/- 0,58) (figure 27.A).

2. Etude du rôle des sous-types des PDE sur l'effet synergique de l'IL-1/ISO dans la sécrétion de l'IL-6

Dans les résultats de l'expérience présentés dans la figure 27.B, on observe que l'effet synergique de l'ISO, bien que présent, est plus faible (SI= 2) que ceux obtenus généralement dans nos expériences (SI > 3).

L'effet de l'inhibition des PDE2, PDE3 ou PDE4, respectivement, est sans effet sur la sécrétion basale de l'IL-6 par les cardiomyocytes à 16h.

L'inhibition sélective de la PDE3 par le cilostamide n'a pas d'effet la sécrétion de l'IL-6 stimulée par l'IL-1 seul, ni sur l'effet synergique de l'ISO.

L'inhibition de la PDE2 ou de la PDE4 par respectivement l'EHNA et le Ro-201724 potentialise fortement l'effet de l'IL-1 seul (SI =3 et SI=3,8, respectivement). De plus, l'effet synergique de l'ISO est aboli en présence de EHNA et il est fortement réduit en présence de Ro (SI=1,2).

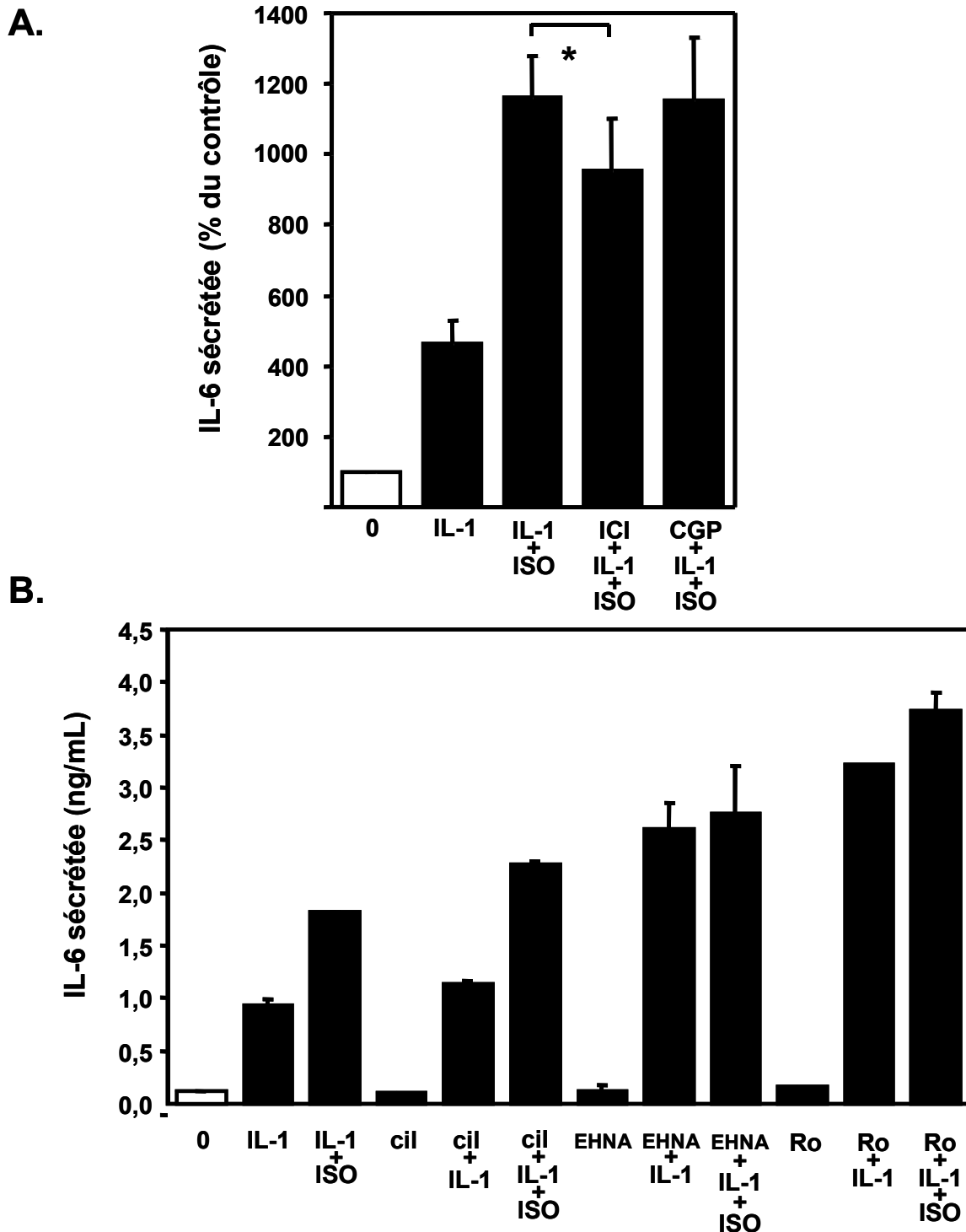


Figure 27 : Les cardiomyocytes sont pré-incubées ou non avec (A) ICI (300 nM), CGP (1 μ M), (B) cil (10 μ M), EHNA (10 μ M) ou Ro (10 μ M) pendant 5 minutes puis sont traités en présence ou non avec IL-1 (40 ng/mL) en combinaison ou non avec de l'ISO (1 μ M). Après 16h d'incubation, les milieux conditionnés sont prélevés et l'IL-6 sécrétée est mesurée par un dosage ELISA. Les résultats présentés sont la moyenne de 3 expériences indépendantes (A) et sont la moyenne d'une expérience mesurée en triple (B). (*) $p < 0,05$.

3. Conclusion-discussion

Dans les cardiomyocytes de rats adultes, nous avons décrit un effet synergique de l'IL-1 et de l'ISO sur l'induction de la sécrétion de l'IL-6 et sur l'expression de son ARNm. Nous avons identifié quelques mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet synergique, comme la voie Gs/cAMP/PKA.

De plus, des résultats préliminaires indiquent que les voies de signalisation activées par les récepteurs β 2-adrénergiques sont impliquées en partie dans l'effet synergique de l'IL-1/ISO. Dans les fibroblastes cardiaques, l'ISO induit la production l'IL-6 et cet effet est également dépendant des récepteurs β 2-adrénergiques et implique les p38-MAPK (Yin et coll., 2006). Nous avons aussi utilisé le SB203580 pour inhiber la voie p38-MAPK. Malheureusement, cet inhibiteur abolit l'effet de l'IL-1 seul sur la sécrétion de l'IL-6 ; nous n'avons donc pas pu observer l'effet du SB203580 sur l'effet synergique de l'IL-1/ISO en présence ou non de l'antagoniste β 2 (l'ICI-118,551).

Nous montrons un effet synergique entre l'IL-1 et la production intracellulaire d'AMPc stimulée par L'ISO. Cependant les taux intracellulaires d'AMPc sont finement régulés par les PDE. Nos résultats indiquent la PDE2 et la PDE4 semblent réguler l'effet synergique de l'IL-1/ISO. Ainsi, dans le cardiomyocyte adulte, une altération de l'expression ou de l'activité des PDE, lors d'une pathologie, pourrait entraîner une production d'IL-6 du fait de la présence de pools d'AMPc intracellulaires non régulés.

Nous avons montré que l'IL-6, en combinaison avec son récepteur soluble, active les voies de signalisation qui impliquent STAT3, ERK1/2 et Akt/p70S6K alors que la voie STAT3 n'est pas stimulée par l'IL-6 seule. Le complexe IL-6/sIL6R stimule la synthèse protéique et induit plusieurs marqueurs de l'hypertrophie cellulaire comme l'expression de l'ARNm du gène de c-fos et la sécrétion du BNP. Ces résultats suggèrent que ces effets sont dépendants de la voie STAT3.

Nous avons montré, pour la première fois, que les cardiomyocytes sécrètent de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 seul ou en combinaison avec l'ISO et que l'IL-6, en association avec son récepteur soluble, a un effet autocrine pro-hypertrophique par le biais du mécanisme de trans-signaling.

L'ensemble du programme expérimental pré-établi nous a permis de mettre en évidence un modèle de régulation de la production de l'IL-6, par l'IL-1 et par l'activation de la voie de l'AMPc, dans le thyrocyte et dans le cardiomyocyte et d'observer que l'IL-6 avait des effets autocrines cellule-spécifiques.

ARTICLE 2

**SYNERGISTIC EFFECT OF SS-ADRENERGIC STIMULATION AND
INTERLEUKIN-1SS ON INTERLEUKIN-6 PRODUCTION BY
CARDIOMYOCYTES: CONTRIBUTION OF INTERLEUKIN-6 TRANS-
SIGNALLING TO HYPERTROPHIC RESPONSE**

**Nicolas Szabo-Fresnais, Florence Lefebvre, Aurore Germain,
Rodolphe Fischmeister and Martine Pomérance**

SOU MIS

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail étaient de caractériser l'effet de l'AMPc sur la production de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 dans les cellules FRTL-5 et dans les cardiomyocytes et d'étudier les effets de l'IL-6 dans ces deux types cellulaires.

Nous avons montré dans les cellules thyroïdiennes FRTL-5 et dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes que l'IL-1 active des voies de signalisation qui vont interagir avec les voies dépendantes de l'AMPc/PKA pour conduire à un processus de synergie dans la régulation « positive » de la production de l'IL-6.

Dans les cellules FRTL-5, nous avons montré que cet effet implique l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de l'IL-6 et, plus particulièrement, les sites AP-1 et CRE. L'expression des facteurs de transcription AP-1 (c-Fos et Fra-2) est augmentée lorsque les voies de signalisation de l'IL-1 et de l'AMPc sont stimulées.

Nous avons caractérisé les voies de signalisation activées en réponse à l'IL-6 seule (cellules FRTL-5 et cardiomyocytes) ou en présence du sIL-6R (cardiomyocytes). Le facteur de transcription STAT3 est phosphorylé en réponse à l'IL-6 dans les deux modèles d'études et nécessite la présence du sIL-6R dans les cardiomyocytes. Les voies des MAPK ERK1/2 et Akt/p70S6K sont également activées en réponse à l'IL-6 dans les cardiomyocytes, indépendamment de la présence du sIL-6R. Enfin, pour la première fois, nous avons mis en évidence dans les cellules FRTL-5, la phosphorylation des MAPKs ERK5 en réponse à IL-6.

Dans les cellules FRTL-5, nous avons observé comme effet propre de l'IL-6 une inhibition de l'expression de l'ARNm du NIS stimulée par la FSK. Par contre, dans les cardiomyocytes, le processus de « trans-signaling » induit plusieurs marqueurs associés à l'hypertrophie cardiaque comme l'expression de l'ARNm de c-fos et la sécrétion du BNP et il induit la synthèse protéique.

Dans cette partie, nous discuterons nos résultats concernant la production de l'IL-6 (taux, mécanismes) en réponse à l'IL-1, lors d'une production intracellulaire d'AMPc et au cours du processus de synergie. Puis nous confronterons nos résultats sur les effets de l'IL-6 avec ceux de la littérature qui ont déjà été caractérisés dans nos modèles d'études ou bien dans d'autres types cellulaires.

Enfin, de manière plus générale, nous ferons l'état de la question sur le rôle de l'IL-6 en condition normale et dans les pathologies.

I. PRODUCTION DE L'IL-6 ET MÉCANISMES IMPLIQUÉS

A. Production sous l'effet de l'IL-1

1. Régulation de la sécrétion de l'IL-6

La sécrétion de l'IL-6 stimulée par l'IL-1 est un phénomène connu de la biologie et elle n'est pas spécifique du type cellulaire (Sehgal et coll., 1987; Shalaby et coll., 1989). Dans les cellules FRTL-5 et dans les cardiomyocytes de rats adultes nous avons montré indirectement que le récepteur de l'IL-1 est présent et fonctionnel puisque nous avons observé une sécrétion d'IL-6 en réponse à l'IL-1; et ceci pour la première fois dans les cardiomyocytes de rats adultes.

Dans les cellules FRTL-5, la sécrétion de l'IL-6 stimulée par l'IL-1 dépasse 1,5 ng par mL de milieu de culture. Dans les cardiomyocytes de rats adultes, nous trouvons que la sécrétion de l'IL-6 sous l'effet d'IL-1 atteint 0,5 ng par mL de milieu de culture. Il n'est pas étonnant dans nos expériences d'obtenir une réponse plus importante avec les cellules FRTL-5 puisque la densité cellulaire est dix fois plus importante que celle des cardiomyocytes. Si l'on devait normaliser la sécrétion d'IL-6 à un même nombre de cellules, la sécrétion de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 serait alors 3 fois plus importante dans les cardiomyocytes.

Dans les cellules FRTL-5 et dans des cultures de thyrocytes humains, des études effectuées par différents groupes au début des années 1990, montrent une sécrétion de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 (Iwamoto et coll., 1991) (Diamant et coll., 1991). Cependant les dosages effectués à l'époque sont exprimés en unités et nous ne pouvons pas confronter ces valeurs à celles que nous avons observées dans nos cellules FRTL-5. Dans la lignée cellulaire HTori3, il a été aussi mis en évidence une sécrétion d'IL-6 dépendante de l'IL-1 (Kennedy et coll., 1992). La libération de l'IL-6 dans des cultures de thyrocytes humains de patients de Basedow peut-être également stimulée par l'IL-1 (Weetman et coll., 1990).

Une voie majeure induite par l'IL-1 au cours de l'inflammation est la stimulation de la synthèse de la COX2, qui permet la production de la prostaglandine E2 (PGE2). Bien qu'il ait été montré dans des cultures primaires de thyrocytes humains, une production de PGE2 en réponse à l'IL-1 après 2h et qui est plus importante à 24h (Kawabe et coll., 1989), nous n'avons pas étudié la production de la PGE2 dans les cellules FRTL-5. En effet, dans la

lignée HTori3, il a été montré que la production de l'IL-6 induite par l'IL-1 n'est pas dépendante de la production de PGE2, bien que le PGE2 est un effet stimulateur la sécrétion de l'IL-6 (Kennedy et coll., 1992).

Dans des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, une stimulation de la sécrétion de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 a aussi été montrée (Matsui et coll., 1999; Yamauchi-Takahara et coll., 1995). Nous retrouvons le même ordre de grandeur pour la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-1 (cinq fois de stimulation par rapport au contrôle).

2. Régulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6

Nous avons montré que la stimulation de la sécrétion de l'IL-6 est dépendante de l'expression transitoire de l'ARNm de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 aussi bien dans les cellules FRTL-5 que dans les cardiomyocytes. Dans le cœur, l'IL-1 régule l'expression de l'IL-6 et une étude montre que les souris KO pour le gène IL-1RI n'expriment plus l'ARNm de l'IL-6 dans le myocarde comparativement à des souris sauvages (Bujak et coll., 2008). Dans la lignée de cellules thyroïdiennes HTori3, ainsi que dans des thyrocytes humains préparés à partir de goitres multi-nodulaires, l'IL-1 stimule l'expression de l'ARNm de l'IL-6. L'effet est maintenu au moins jusqu'à 24 heures de stimulation où l'induction de l'ARNm de l'IL-6 est toujours forte. Cependant, les auteurs n'ont pas testé l'hypothèse d'un effet sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 (Watson et coll., 1995).

B. Production sous l'effet d'autres cytokines

Dans un contexte plus général, il a été rapporté que la production d'IL-6 est stimulée en réponse à d'autres cytokines inflammatoires. Ainsi, dans les cellules HTori3, il a été observé une production d'IL-6 en réponse au TNF- α ou à l'IFN- γ mais les quantités sécrétées sont très inférieures à celles stimulées par l'IL-1 (Kennedy et coll., 1992). Par contre dans les cellules FRTL-5, la sécrétion d'IL-6 en réponse au TNF- α est plus importante (Kikumori et coll., 1998) que celle que nous avons mesuré en présence d'IL-1. Dans les cardiomyocytes de rat nouveau-nés, des travaux avaient montré une stimulation de la sécrétion ou de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 en réponse au TNF- α (Shah et coll., 2005).

C. Production sous l'effet de l'AMPc

1. Régulation de la sécrétion de l'IL-6

Alors que la TSH stimule de manière importante la sécrétion d'IL-6 dans les cellules FRTL-5 (2,4 ng par mL de milieu de culture), nous avons montré que l'augmentation intracellulaire d'AMPc stimule faiblement la sécrétion de l'IL-6 dans nos deux modèles d'études. L'effet observé en présence de TSH peut être dû à la présence de contaminants qui seraient présents dans la préparation de la TSH. En effet, dans l'équipe il a été rapporté que la TSH active la voie de signalisation des MAPK ERK1/2 de manière indépendante du TSHR suggérant la présence de contaminants (Correze et coll., 2000).

Dans des cultures de cellules thyroïdiennes humaines, la TSH est sans effet sur la sécrétion de l'IL-6, bien qu'il y ait une production intracellulaire d'AMPc (Rasmussen et coll., 1994). Par contre, dans la lignée adipocytaire 3T3-L1, mais pas dans les pré-adipocytes, la TSH stimule la libération d'IL-6. Cet effet est dépendant de la voie de l'AMPc (Antunes et coll., 2005). Dans ces deux types cellulaires, un changement au niveau de l'expression des isoformes des AC pourraient influencer la signalisation du TSHR (Serazin-Leroy et coll., 2001). Ainsi, la différence d'effet de la TSH au niveau de la production d'IL-6 dans les FRTL-5 et dans les cellules thyroïdiennes humaines s'expliquerait par une expression différente des isoformes des AC. Le même groupe a montré récemment que la TSH induit la sécrétion de l'IL-6 dans des cultures primaires d'adipocytes humains et que cet effet est partiellement dépendant du facteur NF-kB (Antunes et coll., 2008).

Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'AMPc induit une faible production d'IL-6 (140 ng/mL en présence d'ISO) (Rohrbach et coll., 2007), ce qui correspond à ce que nous avons obtenu dans les cardiomyocytes de rats adultes (250 pg/mL).

2. Régulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6

Dans la lignée de cellules thyroïdiennes PCCL3, nous n'avons pas observé d'effet de la TSH sur l'expression de l'ARNm de l'IL-6 mesurée par PCR en temps réel (données non-publiées). Cependant, dans les cellules FRTL-5, la TSH et la FSK stimulent légèrement l'expression de l'ARNm de l'IL-6 mesurée par Northern blot. Dans ces cellules, il a été montré dans l'équipe que les pools d'AMPc cycliques générés par la FSK et la TSH sont similaires lorsque les cellules sont déprivées pendant sept jours, temps nécessaire pour récupérer une expression et une fonctionnalité du TSHR.

Dans les cardiomyocytes de rats adultes, nous avons observé également une induction importante de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 en réponse à la FSK. Dans le cœur, il avait d'ailleurs été montré *in vivo*, qu'une stimulation β -adrénergique chronique stimule localement l'expression de cytokines pro-inflammatoires au niveau du cœur (Murray et coll., 2000). La régulation adrénergique de la production de l'IL-6 a été mise en évidence dans d'autres types cellulaires comme les astrocytes (Norris et Benveniste, 1993), les hépatocytes (Jung et coll., 2000), les cellules endothéliales (Gornikiewicz et coll., 2000), les fibroblastes cardiaques (Yin et coll., 2006) et les macrophages (Tan et coll., 2007).

D. Production sous l'effet de l'IL-1 en combinaison avec l'AMPC

1. Régulation de la sécrétion de l'IL-6

Dans nos expériences, nous montrons que la sécrétion de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 est augmentée de façon synergique en combinaison avec la FSK dans les cellules FRTL-5 ou avec l'ISO dans les cardiomyocytes de rats adultes. La quantité d'IL-6 sécrétée en réponse à l'IL-1 plus FSK est du même ordre de grandeur que les valeurs rapportées dans les thyrocytes humains obtenus à partir de patients atteints de la maladie de Basedow (Weetman et coll., 1990).

Dans les cardiomyocytes de rats adultes, une seule étude a montré une sécrétion induite de l'IL-6 par les donneurs de NO et les quantités mesurées sont inférieures à 300 pg/mL (Maass et coll., 2005). Nous avons détecté des quantités d'IL-6 sécrétées en réponse à l'IL-1/ISO supérieures à 1 ng/mL. Ces quantités correspondent à des quantités sécrétées mesurées dans des cardiomyocytes humains en culture (Ancy et coll., 2002).

Si nous inhibons la dégradation de l'AMPC, avec l'IBMX, nous observons également un effet synergique entre l'IBMX et l'IL-1 sur la sécrétion de l'IL-6 dans les cardiomyocytes de rats adultes. Plus spécifiquement, nous avons observé un effet synergique entre le EHNA (inhibiteur des PDE2) ou le rolipram (inhibiteur des PDE4) en combinaison avec l'IL-1 dans l'induction de la sécrétion de l'IL-6. Un tel mécanisme de synergie a été aussi décrit dans les ostéoblastes qui implique le peptide vaso-actif intestinal (VIP) en combinaison avec le rolipram (Persson et coll., 2005). Dans les cellules synoviales humaines de sarcome (SW982), la production d'IL-6 induite par l'IL-1 est aussi augmentée en présence de rolipram (Tsuji et coll., 1999). A l'inverse, la sécrétion de l'IL-6 stimulée par le LPS est abolie en présence de rolipram dans les cellules épithéliales alvéolaires (Haddad et coll., 2002) et elle est

significativement diminuée dans l'humeur aqueuse de l'œil de rat (Chi et coll., 2004). L'inhibition pharmacologique ciblée de la dégradation de l'AMPc semble donc avoir des effets différents sur la production d'IL-6 selon le modèle d'étude choisi.

Ici, nous montrons une sécrétion *in vitro* d'IL-6 induite par l'IL-1 qui est potentialisée par l'augmentation intracellulaire d'AMPc. Les taux plasmatiques d'IL-6 sont généralement plus élevés dans la pathologie. Chez les sujets normaux, les taux plasmatiques d'IL-6 sont de l'ordre de 1pg/mL (Grey et coll., 1996; Papanicolaou et coll., 1996). Les taux plasmatiques d'IL-6 sont élevés (supérieurs à 15 pg/mL) chez les patients souffrants d'insuffisance cardiaque congestive (Vasan et coll., 2003). Par ailleurs, les taux plasmatiques d'IL-6 sont connus pour être un outil de diagnostic pour les maladies cardiaques (Petersen et Felker, 2006). Ceci suggère que le processus synergique que nous avons décrit peut se produire *in vivo*.

2. Régulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6

La sécrétion d'IL-6 est probablement reliée à une augmentation de l'ARNm de l'IL-6. En effet, l'IL-1 en combinaison avec la FSK ou l'ISO stimule de manière synergique l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules FRTL-5 et dans les cardiomyocytes. Cet effet est dépendant de l'AMPc. Deux voies peuvent être activées lors d'une augmentation intracellulaire de l'AMPc, la voie PKA et la voie d'Epac. Par exemple, il a été montré que Epac est impliqué dans la libération de l'IL-6 dans la lignée cellulaire de macrophages de souris (RAW) lors d'une stimulation des récepteurs β -adrénergiques (Tan et coll., 2007). Dans les cellules FRTL-5, nous avons montré que Epac n'est pas impliqué dans l'effet synergique de l'AMPc sur la stimulation par l'IL-1 de l'ARNm de l'IL-6. Par contre, l'action significative d'inhibiteurs sélectifs pour la PKA ont permis de montrer que la voie de la PKA était impliquée.

Le mécanisme de synergie impliquant l'IL-1 et l'AMPc dans la stimulation de la production de l'IL-6 a été mis en évidence dans d'autres types cellulaires telles que les cellules mésangiales, les cellules neuronales et les cellules Caco-2 (Bergamaschi et coll., 2006; Grassl et coll., 1999; Hershko et coll., 2002). Ainsi, on peut supposer un paradigme pour la régulation de l'IL-6, en condition physiopathologique : l'expression de l'IL-6 stimulée par l'IL-1 est potentialisée par l'AMPc. Dans ces conditions, le messager hormonal, la TSH

pour le thyrocyte et l'adrénaline/la noradrénaline pour le cardiomyocyte, vont respectivement potentialiser l'effet de l'IL-1.

E. Mécanismes impliqués

1. Le complexe MyD88

Les mécanismes de l'interaction des voies de signalisation de l'IL-1 et celles de l'AMPc qui aboutit à la production de l'IL-6 étaient inconnus. MyD88, un élément essentiel de la voie de signalisation de l'IL-1, pourrait être impliqué dans l'effet synergique de l'AMPc sur la voie de signalisation AP-1. L'analyse *in silico* des séquences de MyD88 indique la présence d'un site consensus pour la PKA dans la partie N-terminale de la protéine. Ainsi, l'AMPc pourrait potentialiser l'activation dépendante de l'IL-1 de MyD88 par une phosphorylation dépendante de la PKA ce qui conduirait par un mécanisme méconnu à l'activation synergique des facteurs de transcription AP-1.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, MyD88 permet le recrutement d'intermédiaires de signalisation, dont TRAF-6. A partir de TRAF-6, deux voies de signalisation divergent : l'une permet l'activation de la voie NF-kB et l'autre active la voies des JNK (Akira et Hoshino, 2003). Un variant d'épissage de MyD88, MyD88s, tronqué de son domaine intermédiaire, empêche le recrutement d'IRAK4 et agit comme un dominant négatif pour l'activation de la voie NF-kB alors que la phosphorylation des JNK n'est pas altérée (Janssens et coll., 2003). MyD88 semble donc jouer un rôle important dans l'activation de la voie NF-kB. Cependant, on ne peut pas exclure un rôle de MyD88 dans la stimulation de la voie conduisant à l'activation des facteurs de transcription AP-1 puisque dans les cellules épithéliales humaines, deux genres bactériens stimulent de manière synergique le gène d'une mucine, muc5AC et ce mécanisme implique MyD88 et le site AP1 du promoteur muc5AC (Shen et coll., 2008).

2. Les voies des p38-MAPK et des JNK

Dans les cellules FRTL-5, nous avons observé que l'IL-1 stimule la phosphorylation des p38-MAPK ainsi que la phosphorylation des JNK. Dans l'équipe, il avait été montré que la FSK stimule les p38-MAPK dans les cellules FRTL-5 mais pas les JNK (Pomerance et coll., 2000). Cependant, par des expériences de Western-blot anti-phospho-JNK et anti-phospho-

p38-MAPK ou par des mesures d'activités des JNK, nous avons montré que la FSK n'avait pas d'effet sur la stimulation de ces protéines kinase par l'IL-1 (données non montrées).

Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'IL-1 stimule la phosphorylation des MAPKs ERK1/2, des p38MAPKs et des JNKs (Ng et coll., 2001). Nous avons utilisé un inhibiteur spécifique pour des p38-MAPK, le SB203580 dans les cardiomyocytes de rats adultes. En présence de cet inhibiteur, la sécrétion de l'IL-6 en réponse à l'IL-1 est abolie. Cependant, en combinaison avec l'ISO, bien que la sécrétion de l'IL-6 soit plus faible qu'en l'absence de l'inhibiteur, on observe un effet synergique : les index de synergie (Cf. matériel et méthodes) en présence ou non de SB203580 sont semblables. Ainsi, dans les cardiomyocytes, l'effet synergique de l'ISO ne semble pas impliquer la voie des p38 MAPK. Par contre, dans les fibroblastes cardiaques et dans le myocarde de souris, l'inhibition sélective des p38 MAPK par le SB203580 inhibe la libération d'IL-6 en réponse à l'ISO. De plus, cet effet est indépendant des voies dépendantes de l'AMPc, PKA et Epac (Yin et coll., 2006).

4. La stabilité de l'ARNm de l'IL-6

Il est connu que les régions 3'-non-traduites des ARNm contribuent à la régulation de l'expression des gènes et les séquences ARE (AU-rich elements) dans la région 3'-UTR ont été identifiées comme des séquences qui affectent la stabilité de l'ARNm. Il a été montré que la voie p38-MAPK/ MAPKAP-K2 est impliquée dans la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 (Neininger et coll., 2002). Bien que l'IL-1 stimule fortement la phosphorylation des p38 MAPK dans les FRTL-5, l'IL-1 ne stabilise pas l'ARNm de l'IL-6 dans nos conditions expérimentales. Il avait déjà été montré que l'IL-1 en présence de TNF- α stabilise l'ARNm de l'IL-6 alors qu'en présence d'IL-1 seul, la demi-vie de l'ARNm de l'IL-6 est plus courte (Elias et Lentz, 1990). Par contre, l'IL-1 stabilise l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules humaines de mésothélium péritonéal humain (Witowski et coll., 1996). Dans les cardiomyocytes de souris nouveau-nés, la stimulation des récepteurs α 1-adrénergique, qui activent la voie NF- κ B et la voie des p38-MAPK stimulent l'expression de l'IL-6 en impliquant en partie la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 (Perez et coll., 2009).

Puisque nous avons observé une stimulation de l'ARNm de l'IL-6 en réponse à l'IL-1, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'IL-1 sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 dans les cardiomyocytes de rats adultes.

Pour la première fois, nous avons montré un effet positif de l'AMPc sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-6. En effet, nous avons observé que la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules FRTL-5 est fortement augmentée en présence de FSK. Dans les cellules thyroïdiennes de chien, la TSH aussi a été rapportée comme impliquée dans la stabilité de l'ARNm de c-myc (Pirson et coll., 1996). Dans les cellules rénales, l'ARNm de la phosphoénol pyruvate carboxykinase est stabilisé par la voie AMPc/PKA (Dhakras et coll., 2006)

Cependant, la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 induite par la FSK est diminuée en présence d'IL-1. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme, différent de celui impliquant les p38-MAPK, serait responsable du processus de stabilité de l'ARNm de l'IL-6 dans nos conditions expérimentales.

Récemment, il a été rapporté que les protéines ribonucléaires AUF1 p37 et p42, qui lient les ARE, pouvaient être impliquées dans la régulation de la stabilisation de l'ARNm de l'IL-6 (Paschoud et coll., 2006). Quatre variants d'épissage de AUF1 ont été mis en évidence (Wagner et coll., 1998) et les effets stabilisants de AUF1 dépend du type d'isoforme donné dans un type cellulaire donné (Loflin et coll., 1999; Xu et coll., 2001).

Il serait intéressant d'étudier si AUF1 est impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de l'IL-6 sous l'effet de la FSK.

5. Régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6

Dans les cellules FRTL-5, nous avons décrit un effet synergique de l'IL-1 et de la FSK sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6. Dans d'autres types cellulaires, ce type de synergie a été décrit (Grassl et coll., 1999; Hershko et coll., 2002). Nous montrons que les sites AP-1 et CRE du promoteur du gène de l'IL-6 sont principalement impliqués dans l'effet synergique de l'AMPc sur la stimulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-6 stimulée par l'IL-1. Par contre, le site NF- κ B du promoteur n'est pas impliqué dans l'effet synergique. Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans les cellules Caco-2 où les sites de liaison pour NF- κ B, C/EBP, CREB et AP-1 sont nécessaires à l'effet synergique (Hershko et coll., 2002). Par contre, dans les cellules FRTL-5, il a été rapporté que l'expression du gène de l'IL-6 stimulé par le TNF- α est dépendante du facteur de transcription NF- κ B et que la TSH stimule l'activation de NF- κ B (Kikumori et coll., 2001).

Ceci suggère que la régulation du gène de l'IL-6 implique des mécanismes qui sont spécifiques du type cellulaire.

Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, il a été montré que l'activation des éléments de réponse AP-1 et CRE du promoteur de l'IL-6 sont suffisants pour induire l'IL-6 en réponse à l'ISO (Rohrbach et coll., 2007). Dans les cellules Caco-2, l'induction de l'IL-6 par l'IL-1 implique le site AP-1 du promoteur et elle est dépendante de la voie PI3K/Akt/IKK α (Cahill et Rogers, 2008). L'activation de cette voie de signalisation en réponse à l'IL-1 n'est pas décrite dans le cœur, ni dans la thyroïde. L'AMPc pourrait donc avoir un effet sur l'activation de cette voie puisque dans les cellules HUVEC, la FSK stimule la phosphorylation de Akt (Namkoong et coll., 2009) mais pas dans les FRTL-5 (Correze et coll., 2005; Saito et coll., 2001), ni dans les thyrocytes de chien (Coulonval et coll., 2000). Une autre hypothèse pour expliquer l'effet de l'AMPc sur le processus de synergie avec l'IL-1 au niveau du site AP-1 est l'inhibition PKA dépendante de IP-1 (inhibitor protein-1) qui régule négativement l'activité des facteurs de transcription AP-1 (AuwerxetSassone-Corsi, 1991). Mais la nature exacte de cet inhibiteur est à ce jour méconnue.

Nos expériences de retard sur gel indiquent que la liaison de protéines nucléaires sur la sonde AP-1 en réponse à l'IL-1 est augmentée lorsque l'on traite les cellules FRTL-5 avec de la FSK. Une telle augmentation n'a pas été observée en utilisant les sondes correspondantes aux autres site de liaison du promoteur. Dans les cellules mésangiales, des expériences similaires ont été réalisées mais les résultats observés sont divergents. L'AMPc augmente la liaison sur la sonde AP-1 mais inhibe la liaison sur la sonde NF- κ B et n'a pas d'effet sur la sonde C/EBP (Grassl et coll., 1999). Par contre, ces auteurs ont trouvé un complexe ADN-protéine constitutif sur la sonde CRE. Nous avons aussi trouvé un complexe constitutif entre les extraits nucléaires de cellules FRTL-5 et la sonde CRE. Ainsi, en fonction du type cellulaire, l'AMPc régule de manière différente les facteurs de transcription impliqués dans la stimulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de l'IL-6.

Dans les cardiomyocytes de rat nouveau-nés, l'IL-1 stimule la liaison de protéines nucléaires sur la sonde NF- κ B et sur la sonde C/EBP et la mutation du site C/EBP du promoteur de l'IL-6 réduit fortement l'activité transcriptionnelle induite par l'IL-1 (Matsui et coll., 1999).

Dans les cellules FRTL-5, nous avons montré que seules les expressions de c-Fos et de Fra2 sont augmentées de manière importante par le traitement IL-1/FSK. L'ARNm de c-fos a déjà été montré comme induit par la TSH et l'AMPc dans les cellules FRTL-5 (Isozaki et Kohn, 1987; Tramontano et coll., 1986) et dans les thyrocytes de chien (Deleu et coll., 1999). Les travaux de notre équipe montrent également une augmentation de l'ARNm de c-fos sous l'effet de la FSK dans les cellules FRTL-5. De plus nous avons étudié l'activité transcriptionnelle du promoteur de c-fos transfecté dans les cellules FRTL-5. Nos résultats préliminaires indiquent que l'IL-1 ou la FSK stimule l'activité transcriptionnelle de ce promoteur et qu'ils ont un effet additif en combinaison,. Dans les kératinocytes HaCaT, l'induction du gène de c-fos est stimulée par l'IL-1 par un mécanisme dépendant des p38-MAPK qui conduisent à la phosphorylation de CREB sur sérine 133 (Schiller et coll., 2006).

Nos expériences suggèrent que le site CRE du promoteur de gène de l'IL-6 peut être impliqué dans l'effet synergique, comme dans d'autres types cellulaires. Cependant, nous n'avons pas observé de changement de l'expression des facteurs de transcription CREB/ATF1 ni d'effet synergique significatif sur la phosphorylation de CREB/ATF1 alors qu'ils sont phosphorylés en réponse à la FSK et à l'IL-1. Nos expériences de retard sur gel montrent que CREB et ATF1 sont liés au site CRE de manière constitutive. Ils seraient donc nécessaires pour stimuler le promoteur de l'IL-6 sans être impliqué directement dans l'effet synergique de IL-1/FSK.

III. SIGNALISATION ET EFFET DE L'IL-6

A. Régulation de l'expression du récepteur de l'IL-6

Nous avons trouvé que le IL-6R est exprimé dans les cellules FRTL-5 et dans les cardiomyocytes de rats adultes. L'expression de l'IL-6 et du IL-6R a été rapporté dans différentes formes de pathologies du tissu thyroïdien. En effet, l'expression de l'IL-6 a été détectée par immunocytochimie dans 100% des cas de maladie de Basedow ou de thyroïdite d'Hashimoto (Ruggeri et coll., 2006). Zheng et coll. (1991) ont observé, par la technique d'immunohistochimie, la présence d'IL-6 dans cellules épithéliales thyroïdiennes. Le pourcentage de cellules positives à l'IL-6 dans des échantillons de thyroïde normale est de 77%. Dans les échantillons issus de thyroïde de Basedow, 90% des thyrocytes sont positifs et 85% sont positifs dans les cas de la thyroïdite d'Hashimoto (Zheng et coll., 1991). En effet,

dans ces 2 maladies, il y a les signes de la présence d'une inflammation comme l'infiltration lymphocytaire et l'expression HLA de type II. Dans la thyroïde de Basedow, le IL-6R est exprimé au niveau des thyrocytes, ce qui suggère que les voies de signalisation dépendante de l'IL-6 sont probablement impliquées dans les désordres auto-immuns. Les carcinomes papillaires thyroïdiens conventionnels expriment aussi l'IL-6 et l'IL-6R (Trovato et coll., 2003).

Dans les cardiomyocytes, les expressions de la gp130 et du IL-6R ont été mises en évidence (Yang et coll., 2007). En utilisant des souris ayant subi ou non une ligation de l'artère coronaire, une équipe a montré que tous les composants indispensables pour la signalisation de l'IL-6, dont le IL-6R, sont exprimés dans les régions non-infarciées du myocarde (Fuchs et coll., 2003). Dans les cardiomyocytes adultes humains, la présence du IL-6R a été détectée par RT-PCR et par Western-blot (Weiss et coll., 2003) ainsi que par immunohistochimie dans des biopsies de ventricules de cœurs insuffisants (Plenz et coll., 2002). Les résultats contradictoires sur l'absence du IL6R obtenus par d'autres équipes (Chandrasekar et coll., 1999; Hirota et coll., 1995; Youker et coll., 1992) peuvent s'expliquer par l'utilisation d'anticorps différents ou bien le fait que d'autres espèces aient été utilisées.

Récemment, des taux élevés de sIL-6R ont été rapportés dans des cas de cardiomyopathies hypertrophiques ou idiopathiques dilatées (Hogye et coll., 2004). Ce résultat supporte l'hypothèse du rôle du trans-signaling dans la signalisation de l'IL-6.

B. Signalisation de l'IL-6

Nous avons montré dans les cellules FRTL-5 que l'IL-6 stimule la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 et de la kinase ERK5 alors que l'IL-6 est sans effet sur celles de Akt et de ERK-1/2. Dans les cardiomyocytes, STAT3 est phosphorylé en réponse à l'IL-6 uniquement en présence du sIL-6R alors que l'IL-6 seule stimule la phosphorylation de ERK1/2 et Akt/P70S6K (Figure 28).

Dans la thyroïde, les données concernant les voies de signalisation dépendantes de l'IL-6 ne sont pas décrites. Une étude montre dans les cellules TT (lignée cellulaire issue d'un carcinome de thyroïde) que le LIF stimule la phosphorylation de STAT3 (Park et coll., 2003), ce qui conduirait à l'inhibition de la croissance de ces cellules (Park et coll., 2005). Dans les cellules FRTL-5, nous montrons pour la première fois une phosphorylation de ERK-5 en réponse à l'IL-6. Aucune étude à ce jour n'a montré l'activation de ERK-5 par l'IL-6 même si, dans le tissu cardiaque pathologique (hypoxie), une corrélation est faite entre l'induction

de ERK-5 et l'induction de l'IL-6 (Chen et coll., 2007). La voie MEK5/ERK5 semble jouer un rôle important dans la réponse hypertrophique par la CT-1 (Takahashi et coll., 2005) et par le LIF (Nicol et coll., 2001).

Il serait donc intéressant d'étudier l'activation de ERK-5 en réponse à l'IL-6 par des mesures d'activités de ERK-5 sur résine MEF2C dans les cardiomyocytes de rats adultes.

Nous avons trouvé que la p70S6K est phosphorylée sur les résidus T421/S424 en réponse à l'IL-6 indépendamment de la présence du sIL-6R. De même, on observe une augmentation de la phosphorylation de la p70S6K sur T389 et de la phosphorylation de la kinase Akt sur S473. La p70S6K a été proposée comme une enzyme-clé dans la synthèse protéique mais son rôle dans les processus conduisant à l'hypertrophie cardiaque est controversée (Proud, 2004).

Dans les cellules d'hépatomes, il a été montré pour la première fois une phosphorylation de Akt en réponse à l'IL-6, cette voie étant impliquée dans l'effet anti-apoptotique de l'IL-6 (Chen et coll., 1999). Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'IL-6 stimule la phosphorylation de Akt (Smart et coll., 2006) et le LIF stimule l'activité kinase de Akt (Oh et coll., 1998) et il induit sa phosphorylation chez l'adulte (Florholmen et coll., 2006).

Nous pourrions donc étudier l'implication de cette voie de signalisation dans l'effet protecteur (par exemple : protection contre l'apoptose) de l'IL-6 dans les cardiomyocytes.

Dans les cardiomyocytes, nous avons observé une différence de signalisation entre STAT3 et ERK1/2 puisque STAT3 est activé par le mécanisme de trans-signaling (figure 28).

Des études antérieures avaient aussi montré qu'en absence du sIL-6R, l'IL-6 stimule la phosphorylation des ERK1/2 mais elle n'a pas d'effet sur la phosphorylation de STAT3 dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Sheng et coll., 1997) ainsi que dans le cœur entier de souris adultes.

Dans les cellules FRTL-5, il serait important d'étudier les voies de signalisation induites par le complexe IL-6/sIL-6R et de les comparer à celles stimulées par l'IL-6 seule (STAT3 et ERK5).

Dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés, la CT-1 stimule la phosphorylation de STAT1 et STAT3 (Fukuzawa et coll., 2000) et aussi ERK1/2 (Tian et coll., 2004). Dans ces cellules, l'effet hypertrophique de la CT-1 est dépendant de STAT-3 alors que la voie ERK-1/2 semble réguler négativement cet effet en inhibant la phosphorylation de STAT3 (Tian et coll., 2004). De même le LIF (mais pas l'IL-6 seule) stimule l'expression du VEGF

en activant la voie JAK/STAT3 (Funamoto et coll., 2000). Aussi, dans d'autres types cellulaires ces deux voies sont décrites comme ayant des effets différents. Dans les hépatocytes, la voie STAT3 stimule la prolifération alors que l'activation des ERK1/2 l'inhibe (Yeoh et coll., 2007). Dans les chondrocytes articulaires bovins, le complexe IL-6/sIL-6R stimule STAT1/STAT3 et ERK1/2 (alors que l'IL-6 seule est sans effet) et les auteurs observent que l'inhibition de la phosphorylation des STAT diminue l'effet de l'IL-6/sIL-6R sur l'expression du collagène de type III alors que l'inhibition des ERK est sans effet (Legendre et coll., 2003).

Nos résultats et ceux de la littérature suggèrent que dans le cœur, la présence du sIL-6R est nécessaire pour la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'IL-6, alors que le LIF et la CT-1, qui stimule la gp130 par le LIFR, active STAT3 sans la nécessité d'un mécanisme de trans-signaling.

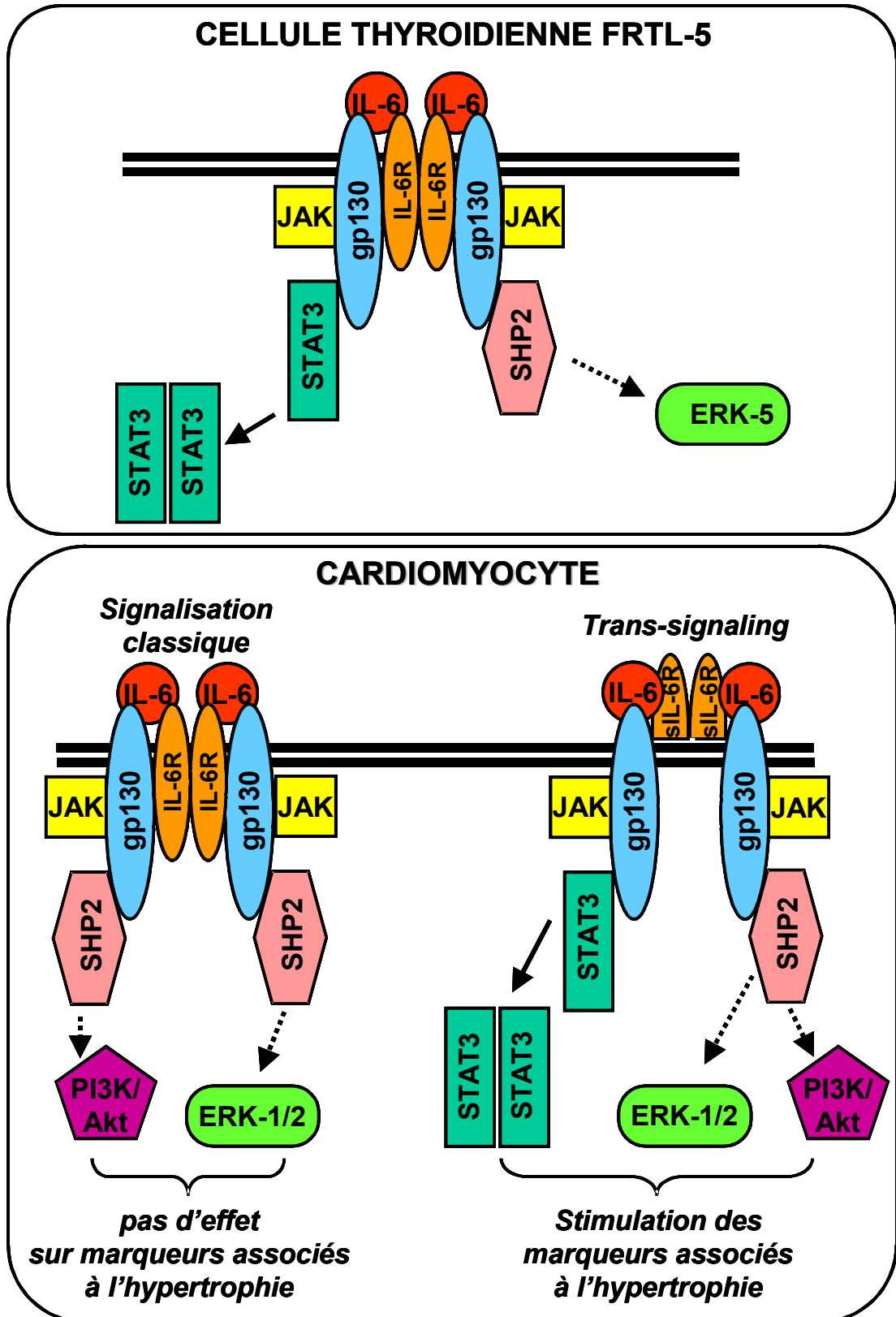


Figure 28: Mise en évidence des voies de signalisation de l'IL-6 dans la cellule thyroïdienne FRTL-5 et dans le cardiomyocyte.

C. Rôle de l'IL-6

Le rôle de l'IL-6 n'est pas encore bien élucidé dans le tissu thyroïdien. En effet, les effets de l'IL-6 sur les cellules immunitaires infiltrantes de la glande thyroïdienne lors de désordres auto-immuns sont connus mais les effets de l'IL-6 dans la thyroïde restent à être caractérisés.

Nous n'avons pas observé d'effets propres de l'IL-6 dans la prolifération, la différenciation (expression des ARNm de Pax8, de la TPO ou de la Tg) ou l'apoptose des cellules FRTL-5. Cependant, la progression du cycle cellulaire stimulée par l'INS en association avec la FSK est réduite par l'IL-6 mais cet effet n'est pas significatif. Dans des cellules de carcinome de la prostate, l'IL-6 régule l'expression de la cycline A1 en activant la voie PI3K/Akt (Wegiel et coll., 2008). L'expression de l'ARNm du NIS induite par la FSK est réduite significativement en présence d'IL-6. Cet effet implique probablement des régulations croisées entre les voies de signalisation de l'AMPc et celles induite par l'IL-6. En effet, il est connu que la TSH régule l'expression de l'ARNm du NIS par la voie dépendante de l'AMPc (Saito et coll., 1997). Dans les cellules FRTL-5, l'IGF-I inhibe l'expression du NIS induite par l'AMPc et cet effet est dépendant de la PI3K (Garcia et Santisteban, 2002). Cependant, l'IL-6 n'altère pas la génération de l'AMPc dans les ostéoblastes (Green et coll., 1994) et nous avons montré que l'IL-6 ne stimule pas la voie PI3K/Akt.

Une autre voie (STAT3, ERK5) pourrait donc être impliquée dans le mécanisme d'inhibition de l'expression du NIS par l'IL-6, laquelle devrait être caractérisée.

Dans une lignée de cellules issues de carcinome thyroïdien, il a été observé que la phosphorylation de STAT3 sous l'effet de l'IL-6, qui est corrélé avec l'expression de Wnt5a, est impliquée dans la motilité et l'adhésion cellulaire (McCall et coll., 2007). Ces résultats suggèrent que la voie IL-6/STAT3 serait une voie importante pour la croissance et la migration des cellules cancéreuses.

Dans les cardiomyocytes, nous montrons que l'IL-6 en présence du sIL-6R stimule la synthèse protéique, l'expression du gène de c-fos et la sécrétion du BNP, qui sont des marqueurs connus associés au processus conduisant à l'hypertrophie cardiaque (figure 28). D'autres membres de la famille de l'IL-6 comme le LIF ou la CT-1 stimule la synthèse protéique (Hiraoka et coll., 2003; Kodama et coll., 1997; Takahashi et coll., 2005) et stimulent la sécrétion du BNP (Takahashi et coll., 2005) dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés. L'expression de c-fos en réponse au LIF est supprimée en présence d'un

inhibiteur spécifique de ERK1/2 (le PD98059) (Kodama et coll., 2000), ce qui suggère que la voie ERK est probablement impliquée dans l'expression induite par le LIF de marqueurs associés au processus hypertrophique. Nous avons observé une activation de cette voie par l'IL-6 seule, alors que l'IL-6 seule n'induit pas une augmentation de l'ARNm de c-fos. Il a été proposé que la voie ERK ne soit pas impliquée dans le processus hypertrophique cardiaque mais qu'elle contrôlerait plutôt la survie induite par les cytokines de la famille de l'IL-6 (Sheng et coll., 1997). De plus, la délétion génétique des MAPK ERK1/2 dans les souris n'affecte pas la réponse hypertrophique cardiaque (Purcell et coll., 2007).

Nos résultats suggérant un rôle important du mécanisme de trans-signaling sont supportés par plusieurs groupes qui ont montré un effet *in vivo* de l'IL-6 impliquant la présence du sIL-6R (Hirota et coll., 1995; Matsushita et coll., 2005). D'ailleurs, *in vivo*, Matsushita et Coll. (2005) observent un effet protecteur du complexe IL-6 / sIL-6R contre l'apoptose alors qu'auparavant Fuchs et coll. (2003) n'avaient pas observé d'effet de l'IL-6. La différence majeure entre les travaux de ces deux équipes est l'utilisation du sIL-6R, qui en combinaison avec l'IL-6 réduit significativement la taille de la zone infarctée du myocarde (Matsushita et coll., 2005). Dans les cardiomyocytes de rat nouveau-nés, le LIF et l'IL-6/sIL6-R stimulent l'expression de l'ARNm de bcl-x, un important régulateur de l'apoptose (Fujio et coll., 1997). Dans les cellules FRTL-5, nous n'avons pas observé d'effet de l'IL-6 sur le processus apoptotique (initié par le TNF- α) ou sur l'expression des ARNm de certains régulateurs de ce processus tels que FADD (« Fas-Associated protein with Death Domain ») ou bcl-xl.

Dans les thyrocytes de porc en culture, L'IL-6 seule n'as pas d'effet alors qu'en présence de son récepteur soluble, il régule négativement le métabolisme de l'iode ou l'expression de la TPO (Isozaki et coll., 1997).

Ainsi, dans les cellules FRTL-5 nous pourrions étudier les effets du trans-signaling de l'IL-6 sur les différents processus que nous avons testés avec l'IL-6 seule (différenciation, prolifération, apoptose).

Le processus qui régule la production de sIL-6R n'est pas encore bien élucidé et les données expérimentales dans le cœur et dans la thyroïde sont inexistantes. Il serait donc important dans l'avenir de définir les lieux de production du sIL-6R et de caractériser les processus permettant sa production. Nous suggérons que le complexe IL-6/sIL-6R, qui peut lier la gp130 avec une meilleure affinité, stimule fortement la phosphorylation de la gp130 sur

résidu tyrosine comme le suggèrent Hirota et coll. (1995). Cette amplification du signal pourrait alors conduire à un signal associé au processus hypertrophique dans le cœur.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons montré qu'il pouvait y avoir un dialogue entre deux voies de signalisation telles que celle de la voie de l'AMPC et celle de l'IL-1, pouvant conduire à une production importante de la cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6. Nous avons montré ce phénomène à la fois dans les cellules thyroïdiennes FRTL-5 et dans les cardiomyocytes de rat adultes. Ce mode d'action existe donc certainement dans tous les systèmes cellulaires où l'AMPC a un rôle « positif » dans des mécanismes de régulation.

Notre travail, dans les cellules thyroïdiennes FRTL-5, a contribué à éclaircir les mécanismes au niveau moléculaire impliqués dans le phénomène de synergie de l'effet de l'AMPC sur la production d'IL-6 en réponse à l'IL-1. Nous avons montré que l'AMPC avait à la fois un rôle sur la stabilité de l'ARNm de l'IL-6 mais agissait aussi indirectement sur le promoteur de l'IL-6. En ce qui concerne la stabilisation de l'ARNm de l'IL-6 par l'AMPC, peu de choses sont connues. Un des aspects originaux de notre travail a été de montrer que l'AMPC agissait sur le site AP-1 du promoteur de l'IL-6 en augmentant l'expression des facteurs AP-1 (c-Fos et Fra2).

La conséquence de l'augmentation de la production d'IL-6 dans le tissu cardiaque, est un rôle probable d'IL-6 dans l'hypertrophie cardiaque puisque nous avons montré que certains marqueurs associés à l'hypertrophie cardiaque sont augmentés sous l'effet d'IL-6. Cependant, ces effets nécessitent le récepteur soluble de l'IL-6. Dans les cellules thyroïdiennes FRTL-5, le rôle du récepteur soluble n'a pas été étudié ni sur la prolifération, ni sur la différenciation, ni sur l'apoptose. Il serait intéressant d'étudier son rôle puisqu'il a été observé des taux élevés de récepteur soluble de l'IL-6 au cours de certaines pathologies thyroïdiennes. Une des questions est alors de comprendre comment et pourquoi le récepteur soluble de l'IL-6 est produit au cours des pathologies. Les mécanismes responsables de la production du récepteur soluble ne sont pas encore complètement élucidés.

Actuellement, de nombreuses études se focalisent sur la production de molécules pharmacologiques qui permettraient d'inhiber le clivage du récepteur ou son activité. Ainsi, il a été mis au point des anticorps humanisés dirigés contre les récepteurs de l'IL-6 (Atlizumab : MRA) qui inhibent l'action biologique de l'IL-6 en particulier au cours de l'arthrite rhumatoïde. Plus récemment, une petite molécule, l'ERBF a été isolée au cours d'un screening qui se comporte comme un antagoniste du récepteur de l'IL-6. Un des enjeux des années qui viennent, serait la mise au point de telles molécules.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ajjan, R.A., Watson, P.F., et Weetman, A.P.** (1996). Cytokines and thyroid function. *Adv Neuroimmunol* 6, 359-386.
- Akazawa, H., et Komuro, I.** (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92, 1079-1088.
- Akira, S.** (1997). IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1401-1418.
- Akira, S., et Hoshino, K.** (2003). Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J Infect Dis* 187 Suppl 2, S356-363.
- Ambesi-Impiombato, F.S., Parks, L.A., et Coon, H.G.** (1980). Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3455-3459.
- Ancey, C., Corbi, P., Froger, J., Delwail, A., Wijdenes, J., Gascan, H., Potreau, D., et Lecron, J.C.** (2002). Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine* 18, 199-205.
- Anhuf, D., Weissenbach, M., Schmitz, J., Sobota, R., Hermanns, H.M., Radtke, S., Linnemann, S., Behrmann, I., Heinrich, P.C., et Schaper, F.** (2000). Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation. *J Immunol* 165, 2535-2543.
- Antos, C.L., Frey, N., Marx, S.O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J.A., Marks, A.R., et Olson, E.N.** (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res* 89, 997-1004.
- Antunes, T.T., Gagnon, A., Bell, A., et Sorisky, A.** (2005). Thyroid-stimulating hormone stimulates interleukin-6 release from 3T3-L1 adipocytes through a cAMP-protein kinase A pathway. *Obes Res* 13, 2066-2071.
- Antunes, T.T., Gagnon, A., Langille, M.L., et Sorisky, A.** (2008). Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-6 release from human adipocytes through activation of the nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology* 149, 3062-3066.
- Armato, U., Andreis, P.G., Belloni, A.S., et Draghi, E.** (1974). Long-term stimulatory effects of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on nuclear and cytoplasmic protein synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Acta Anat (Basel)* 88, 456-480.
- Arsenijevic, T., Degraef, C., Dumont, J.E., Roger, P.P., et Pirson, I.** (2006). G1/S Cyclins interact with regulatory subunit of PKA via A-kinase anchoring protein, AKAP95. *Cell Cycle* 5, 1217-1222.
- Ashizawa, K., Yamashita, S., Tobinaga, T., Nagayama, Y., Kimura, H., Hirayu, H., Izumi, M., et Nagataki, S.** (1989). Inhibition of human thyroid peroxidase gene expression by interleukin 1. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121, 465-469.
- Aust, G., et Scherbaum, W.A.** (1996). Expression of cytokines in the thyroid: thyrocytes as potential cytokine producers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 Suppl 4, 64-67.
- Banzet, S., Koulmann, N., Sanchez, H., Serrurier, B., Peinnequin, A., Alonso, A., et Bigard, X.** (2007). Contraction-induced interleukin-6 transcription in rat slow-type muscle is partly dependent on calcineurin activation. *J Cell Physiol* 210, 596-601.
- Banzet, S., Koulmann, N., Simler, N., Birot, O., Sanchez, H., Chapot, R., Peinnequin, A., et Bigard, X.** (2005). Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: association with calcineurin activity. *J Physiol* 566, 839-847.
- Bartek, J., Bartkova, J., et Lukas, J.** (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8, 805-814.

- Bendtzen, K., Buschard, K., Diamant, M., Horn, T., et Svenson, M.** (1989). Possible role of IL-1, TNF-alpha, and IL-6 in insulin-dependent diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. *Thyroid Cell Group. Lymphokine Res* 8, 335-340.
- Benjamin, E.J., et Levy, D.** (1999). Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci* 317, 168-175.
- Bergamaschi, A., Corsi, M., et Garnier, M.J.** (2006). Synergistic effects of cAMP-dependent signalling pathways and IL-1 on IL-6 production by H19-7/IGF-IR neuronal cells. *Cell Signal* 18, 1679-1684.
- Berridge, M.J.** (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56, 159-193.
- Bers, D.M.** (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
- Bick, R.J., Wood, D.E., Poindexter, B., McMillin, J.B., Karoly, A., Wang, D., Bunting, R., McCann, T., Law, G.J., et Buja, L.M.** (1999). Cytokines increase neonatal cardiac myocyte calcium concentrations: the involvement of nitric oxide and cyclic nucleotides. *J Interferon Cytokine Res* 19, 645-653.
- Bidey, S.P., Lambert, A., et Robertson, W.R.** (1988). Thyroid cell growth, differentiation and function in the FRTL-5 cell line: a survey. *J Endocrinol* 119, 365-376.
- Bishopric, N.H., et Kedes, L.** (1991). Adrenergic regulation of the skeletal alpha-actin gene promoter during myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2132-2136.
- Bonfini, L., Karlovich, C.A., Dasgupta, C., et Banerjee, U.** (1992). The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* 255, 603-606.
- Bos, J.L.** (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 733-738.
- Brach, M.A., Gruss, H.J., Kaisho, T., Asano, Y., Hirano, T., et Herrmann, F.** (1993). Ionizing radiation induces expression of interleukin 6 by human fibroblasts involving activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 268, 8466-8472.
- Breton, M.F., Roger, P.P., Omri, B., Dumont, J.E., et Pavlovic-Hournac, M.** (1989). Thyrotropin but not epidermal growth factor down-regulates the isozyme I (PKa I) of cyclic AMP-dependent protein kinases in dog thyroid cells in primary cultures. *Mol Cell Endocrinol* 61, 49-55.
- Briest, W., Ressler, B., Deten, A., Leicht, M., Morwinski, R., Neichel, D., Wallukat, G., Ziegelhoffer, T., et Zimmer, H.G.** (2003). Norepinephrine-induced interleukin-6 increase in rat hearts: differential signal transduction in myocytes and non-myocytes. *Pflugers Arch* 446, 437-446.
- Bronstad, G., et Christoffersen, T.** (1980). Increased effect of adrenaline on cyclic AMP formation and positive beta-adrenergic modulation of DNA-synthesis in regenerating hepatocytes. *FEBS Lett* 120, 89-93.
- Calebiro, D., de Filippis, T., Lucchi, S., Martinez, F., Porazzi, P., Trivellato, R., Locati, M., Beck-Peccoz, P., et Persani, L.** (2006). Selective modulation of protein kinase A I and II reveals distinct roles in thyroid cell gene expression and growth. *Mol Endocrinol* 20, 3196-3211.
- Cao, X., Kambe, F., et Seo, H.** (2005). Requirement of thyrotropin-dependent complex formation of protein kinase A catalytic subunit with inhibitor of {kappa}B proteins for activation of p65 nuclear factor- κ B by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* 146, 1999-2005.
- Ceuppens, J.L., Baroja, M.L., Lorre, K., Van Damme, J., et Billiau, A.** (1988). Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol* 141, 3868-3874.
- Chandrasekar, B., Mitchell, D.H., Colston, J.T., et Freeman, G.L.** (1999). Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein, interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp130 expression during myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 99, 427-433.

- Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A., et McCubrey, J.A.** (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* *17*, 1263-1293.
- Chen, L.M., Kuo, W.W., Yang, J.J., Wang, S.G., Yeh, Y.L., Tsai, F.J., Ho, Y.J., Chang, M.H., Huang, C.Y., et Lee, S.D.** (2007). Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. *Exp Physiol* *92*, 409-416.
- Chen, R.H., Chang, M.C., Su, Y.H., Tsai, Y.T., et Kuo, M.L.** (1999). Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* *274*, 23013-23019.
- Chien, K.R., Zhu, H., Knowlton, K.U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T.X., et Evans, S.M.** (1993). Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* *55*, 77-95.
- Chiovato, L., Vitti, P., Santini, F., Lopez, G., Mammoli, C., Bassi, P., Giusti, L., Tonacchera, M., Fenzi, G., et Pinchera, A.** (1990). Incidence of antibodies blocking thyrotropin effect in vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* *71*, 40-45.
- Chomczynski, P., et Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- Coclet, J., Foureau, F., Ketelbant, P., Galand, P., et Dumont, J.E.** (1989). Cell population kinetics in dog and human adult thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf)* *31*, 655-665.
- Conti, M.** (2000). Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol* *14*, 1317-1327.
- Correze, C., Blondeau, J.P., et Pomerance, M.** (2000). The thyrotropin receptor is not involved in the activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases by thyrotropin preparations in Chinese hamster ovary cells expressing the human thyrotropin receptor. *Thyroid* *10*, 747-752.
- Correze, C., Blondeau, J.P., et Pomerance, M.** (2005). p38 mitogen-activated protein kinase contributes to cell cycle regulation by cAMP in FRTL-5 thyroid cells. *Eur J Endocrinol* *153*, 123-133.
- Costagliola, S., Swillens, S., Niccoli, P., Dumont, J.E., Vassart, G., et Ludgate, M.** (1992). Binding assay for thyrotropin receptor autoantibodies using the recombinant receptor protein. *J Clin Endocrinol Metab* *75*, 1540-1544.
- Coulouval, K., Vandeput, F., Stein, R.C., Kozma, S.C., Lamy, F., et Dumont, J.E.** (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. *Biochem J* *348 Pt 2*, 351-358.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., et Lefkowitz, R.J.** (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* *390*, 88-91.
- Damante, G., et Di Lauro, R.** (1994). Thyroid-specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* *1218*, 255-266.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E., et Haegeman, G.** (2000). Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3919-3924.
- De Gregorio, G., Coppa, A., Cosentino, C., Ucci, S., Messina, S., Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Di Pardo, A., Avvedimento, E.V., et Porcellini, A.** (2007). The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals. *Oncogene* *26*, 2039-2047.
- de Haij, S., Bakker, A.C., van der Geest, R.N., Haegeman, G., Vanden Berghe, W., Aarbiou, J., Daha, M.R., et van Kooten, C.** (2005). NF-kappaB mediated IL-6 production by renal epithelial cells is regulated by c-jun NH2-terminal kinase. *J Am Soc Nephrol* *16*, 1603-1611.

- Deleu, S., Pirson, I., Coulonval, K., Drouin, A., Taton, M., Clermont, F., Roger, P.P., Nakamura, T., Dumont, J.E., et Maenhaut, C.** (1999). IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol* *149*, 41-51.
- Dendorfer, U., Oettgen, P., et Libermann, T.A.** (1994). Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* *14*, 4443-4454.
- Deshpande, V., et Venkatesh, S.G.** (1999). Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochim Biophys Acta* *1430*, 157-178.
- Deyerle, K.L., Sims, J.E., Dower, S.K., et Bothwell, M.A.** (1992). Pattern of IL-1 receptor gene expression suggests role in noninflammatory processes. *J Immunol* *149*, 1657-1665.
- Dhakras, P.S., Hajarnis, S., Taylor, L., et Curthoys, N.P.** (2006). cAMP-dependent stabilization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in LLC-PK1-F+ kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol* *290*, F313-318.
- Di Palma, T., Nitsch, R., Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R., et Zannini, M.** (2003). The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* *278*, 3395-3402.
- Diamant, M., Kayser, L., Rasmussen, A.K., Bech, K., et Feldt-Rasmussen, U.** (1991). Interleukin-6 production by thyroid epithelial cells. Enhancement by interleukin-1. *Autoimmunity* *11*, 21-26.
- DiFrancesco, D., et Tortora, P.** (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* *351*, 145-147.
- Dinarello, C.A.** (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* *77*, 1627-1652.
- Dinarello, C.A.** (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* *87*, 2095-2147.
- Dinarello, C.A.** (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* *27*, 519-550.
- Ding, B., Abe, J., Wei, H., Xu, H., Che, W., Aizawa, T., Liu, W., Molina, C.A., Sadoshima, J., Blaxall, B.C., et coll.** (2005). A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14771-14776.
- Dodge-Kafka, K.L., Langeberg, L., et Scott, J.D.** (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res* *98*, 993-1001.
- Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C.S., et Urdal, D.L.** (1986). The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature* *324*, 266-268.
- Dower, S.K., Kronheim, S.R., March, C.J., Conlon, P.J., Hopp, T.P., Gillis, S., et Urdal, D.L.** (1985). Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med* *162*, 501-515.
- Dremier, S., Milenkovic, M., Blancquaert, S., Dumont, J.E., Doskeland, S.O., Maenhaut, C., et Roger, P.P.** (2007). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinases, but not exchange proteins directly activated by cAMP (Epac), mediate thyrotropin/cAMP-dependent regulation of thyroid cells. *Endocrinology* *148*, 4612-4622.
- Dumont, J.E., Jauniaux, J.C., et Roger, P.P.** (1989). The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem Sci* *14*, 67-71.

- Dumont, J.E., Lamy, F., Roger, P., et Maenhaut, C.** (1992). Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 72, 667-697.
- Dunn, J.T., et Dunn, A.D.** (2001). Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* 11, 407-414.
- Duprez, L., Parma, J., Van Sande, J., Rodien, P., Sabine, C., Abramowicz, M., Dumont, J.E., et Vassart, G.** (1999). Pathology of the TSH receptor. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12 Suppl 1, 295-302.
- Edwards, J.G.** (2006). In Vivo beta-adrenergic activation of atrial natriuretic factor (ANF) reporter expression. *Mol Cell Biochem* 292, 119-129.
- Eigler, A., Siegmund, B., Emmerich, U., Baumann, K.H., Hartmann, G., et Endres, S.** (1998). Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol* 63, 101-107.
- El Btaouri, H., Rath, G., Morjani, H., Schneider, C., Petitfrere, E., Antonicelli, F., et Martiny, L.** (2006). Interleukin-1beta-induced apoptosis through adenylyl cyclase and ERK1/2 inhibition in primary cultured thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 469-476.
- Elias, J.A., et Lentz, V.** (1990). IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* 145, 161-166.
- Estacion, M., Li, S., Sinkins, W.G., Gosling, M., Bahra, P., Poll, C., Westwick, J., et Schilling, W.P.** (2004). Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* 279, 22047-22056.
- Feliciello, A., Gottesman, M.E., et Avvedimento, E.V.** (2005). cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal* 17, 279-287.
- Feliciello, A., Rubin, C.S., Avvedimento, E.V., et Gottesman, M.E.** (1998). Expression of a kinase anchor protein 121 is regulated by hormones in thyroid and testicular germ cells. *J Biol Chem* 273, 23361-23366.
- Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, R.M., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., Haan, S., Behrmann, I., Yoshimura, A., Johnston, J.A., et coll.** (2004). The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 378, 449-460.
- Fischmeister, R., Castro, L.R., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevicius, J., Leroy, J., et Vandecasteele, G.** (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99, 816-828.
- Fraser, C.M.** (1991). Molecular biology of adrenergic receptors: model systems for the study of G-protein-mediated signal transduction. *Blood Vessels* 28, 93-103.
- Fredj, S., Bescond, J., Louault, C., et Potreau, D.** (2005). Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* 202, 891-899.
- Frey, N., McKinsey, T.A., et Olson, E.N.** (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 6, 1221-1227.
- Frielle, T., Daniel, K.W., Caron, M.G., et Lefkowitz, R.J.** (1988). Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9494-9498.
- Fuchs, M., Hilfiker, A., Kaminski, K., Hilfiker-Kleiner, D., Guener, Z., Klein, G., Podewski, E., Schieffer, B., Rose-John, S., et Drexler, H.** (2003). Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J* 17, 2118-2120.
- Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K., et Kishimoto, T.** (1997). Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 99, 2898-2905.

- Fukuzawa, J., Booz, G.W., Hunt, R.A., Shimizu, N., Karoor, V., Baker, K.M., et Dostal, D.E.** (2000). Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3 : an autocrine loop for hypertrophy. *Hypertension* 35, 1191-1196.
- Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Osugi, T., Hirota, H., Izumi, M., Yoshizaki, K., Walsh, K., et coll.** (2000). Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275, 10561-10566.
- Fusco, A., Berlingieri, M.T., Di Fiore, P.P., Portella, G., Grieco, M., et Vecchio, G.** (1987). One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7, 3365-3370.
- Garcia, B., et Santisteban, P.** (2002). PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16, 342-352.
- Gerard, N., Caillaud, M., Martoriati, A., Goudet, G., et Lalmanach, A.C.** (2004). The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol* 180, 203-212.
- Gerlo, S., Haegeman, G., et Vanden Berghe, W.** (2008). Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells. *Cell Signal* 20, 1489-1496.
- Golden, K.L., Fan, Q.L., Chen, B., Ren, J., O'Connor, J., et Marsh, J.D.** (2000). Adrenergic stimulation regulates Na(+)/Ca(2+)Exchanger expression in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32, 611-620.
- Gornikiewicz, A., Sautner, T., Brostjan, C., Schmierer, B., Fugger, R., Roth, E., Muhlbacher, F., et Bergmann, M.** (2000). Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J* 14, 1093-1100.
- Graeve, L., Korolenko, T.A., Hemmann, U., Weiergraber, O., Dittrich, E., et Heinrich, P.C.** (1996). A complex of the soluble interleukin-6 receptor and interleukin-6 is internalized via the signal transducer gp130. *FEBS Lett* 399, 131-134.
- Grassl, C., Luckow, B., Schlondorff, D., et Dendorfer, U.** (1999). Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10, 1466-1477.
- Green, J., Schotland, S., Sella, Z., et Kleeman, C.R.** (1994). Interleukin-6 attenuates agonist-mediated calcium mobilization in murine osteoblastic cells. *J Clin Invest* 93, 2340-2350.
- Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A., et Ju, G.** (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 270, 13757-13765.
- Grubeck-Loebenstien, B., Buchan, G., Chantry, D., Kassal, H., Londei, M., Pirich, K., Barrett, K., Turner, M., Waldhausl, W., et Feldmann, M.** (1989). Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1 alpha and interleukin-6. *Clin Exp Immunol* 77, 324-330.
- Gruss, H.J., Brach, M.A., et Herrmann, F.** (1992). Involvement of nuclear factor-kappa B in induction of the interleukin-6 gene by leukemia inhibitory factor. *Blood* 80, 2563-2570.
- Gwechenberger, M., Mendoza, L.H., Youker, K.A., Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., Michael, L.H., et Entman, M.L.** (1999). Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 99, 546-551.
- Hannan, R.D., Luyken, J., et Rothblum, L.I.** (1995). Regulation of rDNA transcription factors during cardiomyocyte hypertrophy induced by adrenergic agents. *J Biol Chem* 270, 8290-8297.
- Hashimoto, H., Igarashi, N., Miyawaki, T., et Sato, T.** (1995). Effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 on type I iodothyronine 5'-deiodination in rat thyroid cell line, FRTL-5. *J Interferon Cytokine Res* 15, 367-375.

- Heidkamp, M.C., Bayer, A.L., Martin, J.L., et Samarel, A.M.** (2001). Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C epsilon and delta in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 89, 882-890.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., et Schaper, F.** (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., et Graeve, L.** (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314.
- Heinrich, P.C., Castell, J.V., et Andus, T.** (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265, 621-636.
- Hershko, D.D., Robb, B.W., Luo, G., et Hasselgren, P.O.** (2002). Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R1140-1148.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., et coll.** (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76.
- Hiraoka, E., Kawashima, S., Takahashi, T., Rikitake, Y., Hirase, T., et Yokoyama, M.** (2003). PI 3-kinase-Akt-p70 S6 kinase in hypertrophic responses to leukemia inhibitory factor in cardiac myocytes. *Kobe J Med Sci* 49, 25-37.
- Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., et Taga, T.** (1995). Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4862-4866.
- Hochbaum, D., Hong, K., Barila, G., Ribeiro-Neto, F., et Altschuler, D.L.** (2008). Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J Biol Chem* 283, 4464-4468.
- Hogye, M., Mandi, Y., Csanady, M., Sepp, R., et Buzas, K.** (2004). Comparison of circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in hypertrophic cardiomyopathy and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 94, 249-251.
- Holub, M.C., Szalai, C., Polgar, A., Toth, S., et Falus, A.** (1999). Generation of 'truncated' interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R. *Immunol Lett* 68, 121-124.
- Hong, K., Lou, L., Gupta, S., Ribeiro-Neto, F., et Altschuler, D.L.** (2008). A novel Epac-Rap-PP2A signaling module controls cAMP-dependent Akt regulation. *J Biol Chem* 283, 23129-23138.
- Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., et coll.** (1989). Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 143, 3949-3955.
- Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M., et Yamamoto, N.** (1994). Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* 24, 1945-1948.
- Horsten, U., Schmitz-Van de Leur, H., Mullberg, J., Heinrich, P.C., et Rose-John, S.** (1995). The membrane distal half of gp130 is responsible for the formation of a ternary complex with IL-6 and the IL-6 receptor. *FEBS Lett* 360, 43-46.
- Huang, J., Gao, X., Li, S., et Cao, Z.** (1997). Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12829-12832.

- Hunter, J.J., et Chien, K.R.** (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* *341*, 1276-1283.
- Ihle, J.N.** (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* *84*, 331-334.
- Iitaka, M., Kakinuma, S., Yamanaka, K., Fujimaki, S., Oosuga, I., Wada, S., et Katayama, S.** (2001). Induction of autoimmune hypothyroidism and subsequent hyperthyroidism by TSH receptor antibodies following subacute thyroiditis: a case report. *Endocr J* *48*, 139-142.
- Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P., et Burstein, S.A.** (1989). Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 5953-5957.
- Ishikawa, Y., et Homcy, C.J.** (1997). The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* *80*, 297-304.
- Isozaki, O., et Kohn, L.D.** (1987). Control of c-fos and c-myc proto-oncogene induction in rat thyroid cells in culture. *Mol Endocrinol* *1*, 839-848.
- Isozaki, O., Tsushima, T., Miyakawa, M., Emoto, N., Demura, H., Arai, M., et Sato-Nozoe, Y.** (1997). Oncostatin M: a new potent inhibitor of iodine metabolism inhibits thyroid peroxidase gene expression but not DNA synthesis in porcine thyroid cells in culture. *Thyroid* *7*, 71-77.
- Iwamoto, M., Sakihama, T., Kimura, N., Tasaka, K., et Onaya, T.** (1991). Augmented interleukin 6 production by rat thyrocytes (FRTL5): effect of interleukin 1 beta and thyroid-stimulating hormone. *Cytokine* *3*, 345-349.
- Iwase, M., Uechi, M., Vatner, D.E., Asai, K., Shannon, R.P., Kudej, R.K., Wagner, T.E., Wight, D.C., Patrick, T.A., Ishikawa, Y., et coll.** (1997). Cardiomyopathy induced by cardiac Gs alpha overexpression. *Am J Physiol* *272*, H585-589.
- Janaswami, P.M., Kalvakolanu, D.V., Zhang, Y., et Sen, G.C.** (1992). Transcriptional repression of interleukin-6 gene by adenoviral E1A proteins. *J Biol Chem* *267*, 24886-24891.
- Janssens, S., Burns, K., Vercammen, E., Tschopp, J., et Beyaert, R.** (2003). MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett* *548*, 103-107.
- Jee, S.H., Chiu, H.C., Tsai, T.F., Tsai, W.L., Liao, Y.H., Chu, C.Y., et Kuo, M.L.** (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway is involved in interleukin-6-mediated Mcl-1 upregulation and anti-apoptosis activity in basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol* *119*, 1121-1127.
- Jo, S.H., Leblais, V., Wang, P.H., Crow, M.T., et Xiao, R.P.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalizes the concurrent G(s) signaling during beta2-adrenergic stimulation. *Circ Res* *91*, 46-53.
- Jones, S.A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., et Fuller, G.M.** (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* *15*, 43-58.
- Jung, B.D., Kimura, K., Kitamura, H., Makondo, K., Okita, K., Kawasaki, M., et Saito, M.** (2000). Norepinephrine stimulates interleukin-6 mRNA expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Biochem* *127*, 205-209.
- Kang, S.H., Brown, D.A., Kitajima, I., Xu, X., Heidenreich, O., Gryaznov, S., et Nerenberg, M.** (1996). Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promoter. *J Biol Chem* *271*, 7330-7335.
- Kapteina, A., Paillard, V., et Saunders, M.** (1996). Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J Biol Chem* *271*, 5961-5964.
- Karin, M.** (2005). Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development. *Proc Am Thorac Soc* *2*, 386-390; discussion 394-385.

- Kawabe, Y., Eguchi, K., Shimomura, C., Mine, M., Otsubo, T., Ueki, Y., Tezuka, H., Nakao, H., Kawakami, A., Migita, K., et coll.** (1989). Interleukin-1 production and action in thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 68, 1174-1183.
- Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., Tsuboi, M., Kawabe, Y., Ishikawa, N., Ito, K., et Nagataki, S.** (1996). Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 137, 3163-3169.
- Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., Tsuboi, M., Urayama, S., Kawabe, Y., Tahara, K., Ishikawa, N., Ito, K., et Nagataki, S.** (1997). Modulation of Fas-mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema. *Clin Exp Immunol* 110, 434-439.
- Kennedy, R.L., Jones, T.H., Davies, R., Justice, S.K., et Lemoine, N.R.** (1992). Release of interleukin-6 by human thyroid epithelial cells immortalized by simian virus 40 DNA transfection. *J Endocrinol* 133, 477-482.
- Kikumori, T., Kambe, F., Nagaya, T., Funahashi, H., et Seo, H.** (2001). Thyrotropin modifies activation of nuclear factor kappaB by tumour necrosis factor alpha in rat thyroid cell line. *Biochem J* 354, 573-579.
- Kikumori, T., Kambe, F., Nagaya, T., Imai, T., Funahashi, H., et Seo, H.** (1998). Activation of transcriptionally active nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and its inhibition by antioxidants in rat thyroid FRTL-5 cells. *Endocrinology* 139, 1715-1722.
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., et Roger, P.P.** (2001). Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656.
- Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Makino, S., Baba, A., Hori, S., et Ogawa, S.** (1997). Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 81, 656-663.
- Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., Makino, S., Manabe, T., Murata, M., et Ogawa, S.** (2000). Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H1635-1644.
- Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A., et Onaya, T.** (1997). Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 138, 2227-2232.
- Kolesnick, R.** (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 110, 3-8.
- Kostin, S., Dammer, S., Hein, S., Klovekorn, W.P., Bauer, E.P., et Schaper, J.** (2004). Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* 62, 426-436.
- Krebs, E.G., et Beavo, J.A.** (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 48, 923-959.
- Krogh Rasmussen, A., Bech, K., Feldt-Rasmussen, U., Poulsen, S., Holten, I., Ryberg, M., Dinarello, C.A., Siersbaek-Nielsen, K., Friis, T., et Bendtzen, K.** (1988). Interleukin-1 affects the function of cultured human thyroid cells. *Allergy* 43, 435-441.
- Krogh Rasmussen, A., Kayser, L., Bech, K., Feldt-Rasmussen, U., Perrild, H., et Bendtzen, K.** (1991). Influence of interleukin 6 on the function of secondary cultures of human thyrocytes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124, 577-582.
- Kursawe, R., et Paschke, R.** (2007). Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* 18, 199-207.

- Kyriakis, J.M., et Avruch, J.** (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Laugwitz, K.L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Van Sande, J., Dumont, J.E., et Schultz, G.** (1996). The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 116-120.
- Laurent, E., Mockel, J., Van Sande, J., Graff, I., et Dumont, J.E.** (1987). Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52, 273-278.
- Layland, J., Solaro, R.J., et Shah, A.M.** (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res* 66, 12-21.
- Ledent, C., Coppee, F., Dumont, J.E., Vassart, G., et Parmentier, M.** (1996). Transgenic models for proliferative and hyperfunctional thyroid diseases. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 Suppl 3, 43-46.
- Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J.P., et Bogdanowicz, P.** (2003). JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J Biol Chem* 278, 2903-2912.
- Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R.M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., et coll.** (2003). SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 278, 661-671.
- Li, D.H., Kumanogoh, A., Cao, T.M., Parnes, J.R., et Cullen, J.M.** (2004). Woodchuck interleukin-6 gene: structure, characterization, and biologic activity. *Gene* 342, 157-164.
- Li, M., West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J., Scheuer, T., et Catterall, W.A.** (1993). Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* 261, 1439-1442.
- Limbird, L.E.** (1988). Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J* 2, 2686-2695.
- Liu, A.Y.** (1982). Differentiation-specific increase of cAMP-dependent protein kinase in the 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 257, 298-306.
- Liu, L., McBride, K.M., et Reich, N.C.** (2005). STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8150-8155.
- Loflin, P., Chen, C.Y., et Shyu, A.B.** (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* 13, 1884-1897.
- Lomedico, P.T., Gubler, U., Hellmann, C.P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.C., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.O., et Mizel, S.B.** (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature* 312, 458-462.
- Long, C.S.** (2001). The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev* 6, 81-94.
- Loosfelt, H., Pichon, C., Jolivet, A., Misrahi, M., Caillou, B., Jamous, M., Vannier, B., et Milgrom, E.** (1992). Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3765-3769.
- Lou, L., Urbani, J., Ribeiro-Neto, F., et Altschuler, D.L.** (2002). cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b. *J Biol Chem* 277, 32799-32806.
- Lust, J.A., Donovan, K.A., Kline, M.P., Greipp, P.R., Kyle, R.A., et Maihle, N.J.** (1992). Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 4, 96-100.

- MacGowan, G.A., Mann, D.L., Kormos, R.L., Feldman, A.M., et Murali, S.** (1997). Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol* 79, 1128-1131.
- Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P.C., et Rose-John, S.** (1992). Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J Immunol* 149, 2021-2027.
- Mahtani, K.R., Brook, M., Dean, J.L., Sully, G., Saklatvala, J., et Clark, A.R.** (2001). Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol* 21, 6461-6469.
- Marcelo, C.L.** (1979). Differential effects of cAMP and cGMP on in vitro epidermal cell growth. *Exp Cell Res* 120, 201-210.
- March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., et coll.** (1985). Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.
- Mari, D., Di Berardino, F., et Cugno, M.** (2002). Chronic heart failure and the immune system. *Clin Rev Allergy Immunol* 23, 325-340.
- Marks, A.R.** (2000). Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res* 87, 8-11.
- Martin, M.U., et Wesche, H.** (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1592, 265-280.
- Mascia, A., De Felice, M., Lipardi, C., Gentile, R., Cali, G., Zannini, M., Di Lauro, R., et Nitsch, L.** (1997). Transfection of TTF-1 gene induces thyroglobulin gene expression in undifferentiated FRT cells. *Biochim Biophys Acta* 1354, 171-181.
- Matsui, H., Ihara, Y., Fujio, Y., Kunisada, K., Akira, S., Kishimoto, T., et Yamauchi-Takahara, K.** (1999). Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 42, 104-112.
- Matsushita, K., Iwanaga, S., Oda, T., Kimura, K., Shimada, M., Sano, M., Umezawa, A., Hata, J., et Ogawa, S.** (2005). Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest* 85, 1210-1223.
- May, L.T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S.B., Stoeber, Z., Helfgott, D.C., Chiorazzi, N., Grieninger, G., et Sehgal, P.B.** (1988). Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* 263, 7760-7766.
- McCall, K.D., Harii, N., Lewis, C.J., Malgor, R., Kim, W.B., Saji, M., Kohn, A.D., Moon, R.T., et Kohn, L.D.** (2007). High basal levels of functional toll-like receptor 3 (TLR3) and noncanonical Wnt5a are expressed in papillary thyroid cancer and are coordinately decreased by phenylmethimazole together with cell proliferation and migration. *Endocrinology* 148, 4226-4237.
- McConnachie, G., Langeberg, L.K., et Scott, J.D.** (2006). AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 12, 317-323.
- McMahan, C.J., Slack, J.L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S.D., Brunton, L.L., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I., et coll.** (1991). A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 10, 2821-2832.
- Medina, D.L., Suzuki, K., Pietrarelli, M., Okajima, F., Kohn, L.D., et Santisteban, P.** (2000). Role of insulin and serum on thyrotropin regulation of thyroid transcription factor-1 and pax-8 genes expression in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* 10, 295-303.

- Mei, F.C., Qiao, J., Tsygankova, O.M., Meinkoth, J.L., Quilliam, L.A., et Cheng, X.** (2002). Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem* 277, 11497-11504.
- Mercurio, F., et Manning, A.M.** (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* 11, 226-232.
- Mery, P.F., Lohmann, S.M., Walter, U., et Fischmeister, R.** (1991). Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1197-1201.
- Mezosi, E., Wang, S.H., Utsugi, S., Bajnok, L., Bretz, J.D., Gauger, P.G., Thompson, N.W., et Baker, J.R., Jr.** (2004). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor (TNF)-alpha sensitize human thyroid epithelial cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis through increases in procaspase-7 and bid, and the down-regulation of p44/42 mitogen-activated protein kinase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 250-257.
- Miccadei, S., De Leo, R., Zammarchi, E., Natali, P.G., et Civitareale, D.** (2002). The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay. *Mol Endocrinol* 16, 837-846.
- Milligan, G., et Kostenis, E.** (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S46-55.
- Mine, M., Tramontano, D., Chin, W.W., et Ingbar, S.H.** (1987). Interleukin-1 stimulates thyroid cell growth and increases the concentration of the c-myc proto-oncogene mRNA in thyroid follicular cells in culture. *Endocrinology* 120, 1212-1214.
- Miyazaki, A., Hanafusa, T., Itoh, N., Miyagawa, J., Kono, N., Tarui, S., Kiyotaki, C., et Yoshizaki, K.** (1989). Demonstration of interleukin-1 beta on perifollicular endothelial cells in the thyroid glands of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 69, 738-744.
- Moore, A.R., et Willoughby, D.A.** (1995). The role of cAMP regulation in controlling inflammation. *Clin Exp Immunol* 101, 387-389.
- Mullberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C., et Rose-John, S.** (1994). The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 152, 4958-4968.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., et Kishimoto, T.** (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-1810.
- Murray, D.R., Prabhu, S.D., et Chandrasekar, B.** (2000). Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation* 101, 2338-2341.
- Murriel, C.L., Churchill, E., Inagaki, K., Szweda, L.I., et Mochly-Rosen, D.** (2004). Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem* 279, 47985-47991.
- Namkoong, S., Kim, C.K., Cho, Y.L., Kim, J.H., Lee, H., Ha, K.S., Choe, J., Kim, P.H., Won, M.H., Kwon, Y.G., et coll.** (2009). Forskolin increases angiogenesis through the coordinated cross-talk of PKA-dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling. *Cell Signal* 21, 906-915.
- Neininger, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.D., Holtmann, H., Kollias, G., et Gaestel, M.** (2002). MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 277, 3065-3068.
- Neves, S.R., Ram, P.T., et Iyengar, R.** (2002). G protein pathways. *Science* 296, 1636-1639.
- Nicholson, S.E., De Souza, D., Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., et coll.** (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6493-6498.

- Nicol, R.L., Frey, N., Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J., et Olson, E.N.** (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J* 20, 2757-2767.
- Nicola, N.A., Metcalf, D., Matsumoto, M., et Johnson, G.R.** (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 258, 9017-9023.
- Nilsson, M., Bjorkman, U., Ekholm, R., et Ericson, L.E.** (1992). Polarized efflux of iodide in porcine thyrocytes occurs via a cAMP-regulated iodide channel in the apical plasma membrane. *Acta Endocrinol (Copenh)* 126, 67-74.
- Nishida, T., Nishino, N., Takano, M., Sekiguchi, Y., Kawai, K., Mizuno, K., Nakai, S., Masui, Y., et Hirai, Y.** (1989). Molecular cloning and expression of rat interleukin-1 alpha cDNA. *J Biochem* 105, 351-357.
- Nishiyama, S., Takada, K., Tada, H., Takano, T., et Amino, N.** (1993). Effect of interleukin-6 on cell proliferation of FRTL-5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 319-323.
- Norris, J.G., et Benveniste, E.N.** (1993). Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. *J Neuroimmunol* 45, 137-145.
- Northemann, W., Braciak, T.A., Hattori, M., Lee, F., et Fey, G.H.** (1989). Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J Biol Chem* 264, 16072-16082.
- Nunez, J., et Pommier, J.** (1982). Formation of thyroid hormones. *Vitam Horm* 39, 175-229.
- O'Neill, L.A., et Greene, C.** (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63, 650-657.
- Odell, W.D., Utiger, R.D., Wilber, J.F., et Condliffe, P.G.** (1967). Estimation of the secretion rate of thyrotropin in man. *J Clin Invest* 46, 953-959.
- Oh, H., Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Matsui, H., Kishimoto, T., et Yamauchi-Takahara, K.** (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273, 9703-9710.
- Oh, J.W., Revel, M., et Chebath, J.** (1996). A soluble interleukin 6 receptor isolated from conditioned medium of human breast cancer cells is encoded by a differentially spliced mRNA. *Cytokine* 8, 401-409.
- Ohmori, M., Ohta, M., Shimura, H., Shimurat, Y., Suzuki, K., et Kohn, L.D.** (1996). Cloning of the single strand DNA-binding protein important for maximal expression and thyrotropin (TSH)-induced negative regulation of the TSH receptor. *Mol Endocrinol* 10, 1407-1424.
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., et Kishimoto, T.** (1988). IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 141, 1543-1549.
- Okada, M., Sakaguchi, N., Yoshimura, N., Hara, H., Shimizu, K., Yoshida, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, S., Yamamura, Y., et Kishimoto, T.** (1983). B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med* 157, 583-590.
- Oki, N., Takahashi, S.I., Hidaka, H., et Conti, M.** (2000). Short term feedback regulation of cAMP in FRTL-5 thyroid cells. Role of PDE4D3 phosphodiesterase activation. *J Biol Chem* 275, 10831-10837.
- Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y., et Sasayama, S.** (1998). Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 98, 149-156.
- Ossendorp, F.A., Bruning, P.F., Schuurung, E.M., Van Den Brink, J.A., van der Heide, D., De Vijlder, J.J., et De Bruin, T.W.** (1990). Thyrotropin dependent and independent thyroid cell lines selected from FRTL-5 derived tumors grown in nude mice. *Endocrinology* 127, 419-430.

- Palmieri, E.A., Benincasa, G., Di Rella, F., Casaburi, C., Monti, M.G., De Simone, G., Chiariotti, L., Palombini, L., Bruni, C.B., Sacca, L., et coll.** (2002). Differential expression of TNF-alpha, IL-6, and IGF-1 by graded mechanical stress in normal rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *282*, H926-934.
- Park, J.I., Strock, C.J., Ball, D.W., et Nelkin, B.D.** (2003). The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol* *23*, 543-554.
- Park, J.I., Strock, C.J., Ball, D.W., et Nelkin, B.D.** (2005). Interleukin-1beta can mediate growth arrest and differentiation via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *Cytokine* *29*, 125-134.
- Parmentier, M., Libert, F., Maenhaut, C., Lefort, A., Gerard, C., Perret, J., Van Sande, J., Dumont, J.E., et Vassart, G.** (1989). Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* *246*, 1620-1622.
- Parry, G.C., et Mackman, N.** (1997). Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. *J Immunol* *159*, 5450-5456.
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R., et Zannini, M.** (2000). Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13144-13149.
- Paschoud, S., Dogar, A.M., Kuntz, C., Grisoni-Neupert, B., Richman, L., et Kuhn, L.C.** (2006). Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol Cell Biol* *26*, 8228-8241.
- Patten, M., Hartogensis, W.E., et Long, C.S.** (1996). Interleukin-1beta is a negative transcriptional regulator of alpha1-adrenergic induced gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem* *271*, 21134-21141.
- Patwardhan, N.A., et Lombardi, A.** (1991). Effect of tumor necrosis factor on growth and function in FRTL5 cells. *Surgery* *110*, 972-977.
- Pekary, A.E., Berg, L., Santini, F., Chopra, I., et Hershman, J.M.** (1994). Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* *101*, R31-35.
- Perez, D.M., Papay, R.S., et Shi, T.** (2009). {alpha}1-Adrenergic Receptor Stimulates IL-6 Expression and Secretion through both mRNA Stability and Transcriptional Regulation: Involvement of p38 MAPK and NF-{kappa}B. *Mol Pharmacol*.
- Persson, E., Voznesensky, O.S., Huang, Y.F., et Lerner, U.H.** (2005). Increased expression of interleukin-6 by vasoactive intestinal peptide is associated with regulation of CREB, AP-1 and C/EBP, but not NF-kappaB, in mouse calvarial osteoblasts. *Bone* *37*, 513-529.
- Petersen, J.W., et Felker, G.M.** (2006). Inflammatory biomarkers in heart failure. *Congest Heart Fail* *12*, 324-328.
- Pohl, V., Roger, P.P., Christophe, D., Pattyn, G., Vassart, G., et Dumont, J.E.** (1990). Differentiation expression during proliferative activity induced through different pathways: in situ hybridization study of thyroglobulin gene expression in thyroid epithelial cells. *J Cell Biol* *111*, 663-672.
- Pomerance, M., Abdullah, H.B., Kamerji, S., Correze, C., et Blondeau, J.P.** (2000). Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. *J Biol Chem* *275*, 40539-40546.
- Pomerance, M., Carapau, D., Chantoux, F., Mockey, M., Correze, C., Francon, J., et Blondeau, J.P.** (2003). CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein expression and transcriptional activity are regulated by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in thyroid cells. *Mol Endocrinol* *17*, 2283-2294.

- Poupart, P., Vandenabeele, P., Cayphas, S., Van Snick, J., Haegeman, G., Kruys, V., Fiers, W., et Content, J.** (1987). B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HulFN-beta 2, HPGF). *EMBO J* 6, 1219-1224.
- Prabhu, S.D.** (2004). Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res* 95, 1140-1153.
- Proud, C.G.** (2004). Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63, 403-413.
- Pu, W.T., Ma, Q., et Izumo, S.** (2003). NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro. *Circ Res* 92, 725-731.
- Ralph, R.K.** (1983). Cyclic AMP, calcium and control of cell growth. *FEBS Lett* 161, 1-8.
- Raman, M., Chen, W., et Cobb, M.H.** (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.
- Ramji, D.P., et Foka, P.** (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365, 561-575.
- Rasmussen, A.K., Diamant, M., Blichert-Toft, M., Bendtzen, K., et Feldt-Rasmussen, U.** (1997). The effects of interleukin-1beta (IL-1beta) on human thyrocyte functions are counteracted by the IL-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 138, 2043-2048.
- Rasmussen, A.K., Kayser, L., Feldt-Rasmussen, U., et Bendtzen, K.** (1994). Influence of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-beta and interferon-gamma, separately and added together with interleukin-1 beta, on the function of cultured human thyroid cells. *J Endocrinol* 143, 359-365.
- Ray, A., Tatter, S.B., May, L.T., et Sehgal, P.B.** (1988). Activation of the human "beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6701-6705.
- Reimers, J.I., Rasmussen, A.K., Karlsen, A.E., Bjerre, U., Liang, H., Morin, O., Andersen, H.U., Mandrup-Poulsen, T., Burger, A.G., Feldt-Rasmussen, U., et coll.** (1996). Interleukin-1 beta inhibits rat thyroid cell function in vivo and in vitro by an NO-independent mechanism and induces hypothyroidism and accelerated thyroiditis in diabetes-prone BB rats. *J Endocrinol* 151, 147-157.
- Rodbell, M.** (1995). Signal transduction: evolution of an idea. *Environ Health Perspect* 103, 338-345.
- Rodriguez, A.M., Perron, B., Lacroix, L., Caillou, B., Leblanc, G., Schlumberger, M., Bidart, J.M., et Pourcher, T.** (2002). Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3500-3503.
- Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., et Hanson, R.W.** (1988). Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 263, 9063-9066.
- Roger, P., Taton, M., Van Sande, J., et Dumont, J.E.** (1988). Mitogenic effects of thyrotropin and adenosine 3',5'-monophosphate in differentiated normal human thyroid cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 66, 1158-1165.
- Roger, P.P., et Dumont, J.E.** (1984). Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 36, 79-93.
- Rohrbach, S., Engelhardt, S., Lohse, M.J., Werdan, K., Holtz, J., et Muller-Werdan, U.** (2007). Activation of AP-1 contributes to the beta-adrenoceptor-mediated myocardial induction of interleukin-6. *Mol Med* 13, 605-614.
- Rozec, B., et Gauthier, C.** (2006). beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* 111, 652-673.

- Ruggeri, R.M., Barresi, G., Sciacchitano, S., Trimarchi, F., Benvenga, S., et Trovato, M.** (2006). Immunoeexpression of the CD30 ligand/CD30 and IL-6/IL-6R signals in thyroid autoimmune diseases. *Histol Histopathol* *21*, 249-256.
- Rump, L.C., Riera-Knorrenschild, G., Schwertfeger, E., Bohmann, C., Spillner, G., et Schollmeyer, P.** (1995). Dopaminergic and alpha-adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* *26*, 462-470.
- Ryan, R.J., Charlesworth, M.C., McCormick, D.J., Milius, R.P., et Keutmann, H.T.** (1988). The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *FASEB J* *2*, 2661-2669.
- Saadane, N., Alpert, L., et Chalifour, L.E.** (1999). Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol* *127*, 1165-1176.
- Saily, M., Koistinen, P., Pulkki, K., Zheng, A., et Savolainen, E.R.** (1998). Acute myeloblastic leukaemia cells produce soluble interleukin 6 receptor by a mechanism of alternative splicing. *Cytokine* *10*, 860-867.
- Saito, J., Kohn, A.D., Roth, R.A., Noguchi, Y., Tatsumo, I., Hirai, A., Suzuki, K., Kohn, L.D., Saji, M., et Ringel, M.D.** (2001). Regulation of FRTL-5 thyroid cell growth by phosphatidylinositol (OH) 3 kinase-dependent Akt-mediated signaling. *Thyroid* *11*, 339-351.
- Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., et Kishimoto, T.** (1992). Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* *148*, 4066-4071.
- Saito, T., Endo, T., Kawaguchi, A., Ikeda, M., Nakazato, M., Kogai, T., et Onaya, T.** (1997). Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* *82*, 3331-3336.
- Saji, M., Ikuyama, S., Akamizu, T., et Kohn, L.D.** (1991). Increases in cytosolic Ca⁺⁺ down regulate thyrotropin receptor gene expression by a mechanism different from the cAMP signal. *Biochem Biophys Res Commun* *176*, 94-101.
- Salameh, A., Krautblatter, S., Baessler, S., Karl, S., Rojas Gomez, D., Dhein, S., et Pfeiffer, D.** (2008). Signal transduction and transcriptional control of cardiac connexin43 up-regulation after alpha 1-adrenoceptor stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* *326*, 315-322.
- Salvi, M., Girasole, G., Pedrazzoni, M., Passeri, M., Giuliani, N., Minelli, R., Braverman, L.E., et Roti, E.** (1996). Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* *81*, 2976-2979.
- Sanceau, J., Kaisho, T., Hirano, T., et Wietzerbin, J.** (1995). Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *J Biol Chem* *270*, 27920-27931.
- Sano, M., Fukuda, K., Kodama, H., Takahashi, T., Kato, T., Hakuno, D., Sato, T., Manabe, T., Tahara, S., et Ogawa, S.** (2000). Autocrine/Paracrine secretion of IL-6 family cytokines causes angiotensin II-induced delayed STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* *269*, 798-802.
- Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Harada, M., et coll.** (2001). ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* *89*, 661-669.
- Schaak, S., Mialet-Perez, J., Flordellis, C., et Paris, H.** (2007). Genetic variation of human adrenergic receptors: from molecular and functional properties to clinical and pharmacogenetic implications. *Curr Top Med Chem* *7*, 217-231.
- Schaffhausen, B.** (1995). SH2 domain structure and function. *Biochim Biophys Acta* *1242*, 61-75.

- Scheller, J., et Rose-John, S.** (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195, 173-183.
- Schiller, M., Bohm, M., Dennler, S., Ehrchen, J.M., et Mauviel, A.** (2006). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, c-fos gene expression in keratinocytes. *Oncogene* 25, 4449-4457.
- Schneider, C., Delorme, N., Buisson-Legendre, N., Bellon, G., Emonard, H., Btaouri, H.E., Hornebeck, W., Haye, B., et Martiny, L.** (2000). Involvement of the ceramide signaling pathway in modulating the differentiated state of porcine thyroid cells. *Lipids* 35, 1259-1268.
- Schreur, K.D., et Liu, S.** (1997). Involvement of ceramide in inhibitory effect of IL-1 beta on L-type Ca²⁺ current in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 272, H2591-2598.
- Scott, J.D.** (1991). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther* 50, 123-145.
- Seamon, K.B., Padgett, W., et Daly, J.W.** (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3363-3367.
- Sehgal, P.B., Walther, Z., et Tamm, I.** (1987). Rapid enhancement of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3663-3667.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., et Yoneda, Y.** (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* 16, 7067-7077.
- Shah, R.D., Gonzales, F., Golez, E., Augustin, D., Caudillo, S., Abbott, A., Morello, J., McDonough, P.M., Paolini, P.J., et Shubeita, H.E.** (2005). The antidiabetic agent rosiglitazone upregulates SERCA2 and enhances TNF-alpha- and LPS-induced NF-kappaB-dependent transcription and TNF-alpha-induced IL-6 secretion in ventricular myocytes. *Cell Physiol Biochem* 15, 41-50.
- Shalaby, M.R., Waage, A., et Espevik, T.** (1989). Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. *Cell Immunol* 121, 372-382.
- Shen, H., Yoshida, H., Yan, F., Li, W., Xu, F., Huang, H., Jono, H., et Li, J.D.** (2008). Synergistic induction of MUC5AC mucin by nontypeable Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 795-800.
- Shi, Y., Hsu, J.H., Hu, L., Gera, J., et Lichtenstein, A.** (2002). Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6. *J Biol Chem* 277, 15712-15720.
- Shim, J., et Karin, M.** (2002). The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. *Mol Cells* 14, 323-331.
- Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S., et Yamamoto, K.** (1990). Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol* 10, 561-568.
- Simons, P.J., Delemarre, F.G., et Drexhage, H.A.** (1998). Antigen-presenting dendritic cells as regulators of the growth of thyrocytes: a role of interleukin-1beta and interleukin-6. *Endocrinology* 139, 3148-3156.
- Sims, J.E., Giri, J.G., et Dower, S.K.** (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol* 72, 9-14.
- Sims, J.E., March, C.J., Cosman, D., Widmer, M.B., MacDonald, H.R., McMahan, C.J., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jackson, J.L., Call, S.M., et coll.** (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241, 585-589.

- Skalhegg, B.S., et Tasken, K.** (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 5, D678-693.
- Slack, J., McMahan, C.J., Waugh, S., Schooley, K., Spriggs, M.K., Sims, J.E., et Dower, S.K.** (1993). Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem* 268, 2513-2524.
- Small, K.M., Wagoner, L.E., Levin, A.M., Kardia, S.L., et Liggett, S.B.** (2002). Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 347, 1135-1142.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., et Klenk, D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Spitzweg, C., Joba, W., Morris, J.C., et Heufelder, A.E.** (1999). Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* 9, 821-830.
- Srivastava, S., Chandrasekar, B., Gu, Y., Luo, J., Hamid, T., Hill, B.G., et Prabhu, S.D.** (2007). Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to beta-adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovasc Res* 74, 445-455.
- Stassi, G., et De Maria, R.** (2002). Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, 195-204.
- Stein, B.C., et Levin, R.I.** (1998). Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J* 135, 914-923.
- Sutherland, E.W., et Rall, T.W.** (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232, 1077-1091.
- Sutherland, E.W., Rall, T.W., et Menon, T.** (1962). Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. *J Biol Chem* 237, 1220-1227.
- Szabo-Fresnais, N., Blondeau, J.P., et Pomerance, M.** (2008). Activation of the cAMP pathway synergistically increases IL-1-induced IL-6 gene expression in FRTL-5 thyroid cells: involvement of AP-1 transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 284, 28-37.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., et Kishimoto, T.** (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-581.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., et Hirano, T.** (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 18, 4109-4117.
- Takahashi, N., Saito, Y., Kuwahara, K., Harada, M., Tanimoto, K., Nakagawa, Y., Kawakami, R., Nakanishi, M., Yasuno, S., Usami, S., et coll.** (2005). Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 38, 185-192.
- Takahashi, S.I., Nedachi, T., Fukushima, T., Umesaki, K., Ito, Y., Hakuno, F., Van Wyk, J.J., et Conti, M.** (2001). Long-term hormonal regulation of the cAMP-specific phosphodiesterases in cultured FRTL-5 thyroid cells. *Biochim Biophys Acta* 1540, 68-81.
- Taki, K., Kogai, T., Kanamoto, Y., Hershman, J.M., et Brent, G.A.** (2002). A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol* 16, 2266-2282.

- Takii, T., Akahoshi, T., Kato, K., Hayashi, H., Marunouchi, T., et Onozaki, K.** (1992). Interleukin-1 up-regulates transcription of its own receptor in a human fibroblast cell line TIG-1: role of endogenous PGE2 and cAMP. *Eur J Immunol* *22*, 1221-1227.
- Tan, K.S., Nackley, A.G., Satterfield, K., Maixner, W., Diatchenko, L., et Flood, P.M.** (2007). Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal* *19*, 251-260.
- Tanabe, O., Akira, S., Kamiya, T., Wong, G.G., Hirano, T., et Kishimoto, T.** (1988). Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J Immunol* *141*, 3875-3881.
- Tanaka, T., Kanda, T., Takahashi, T., Saegusa, S., Moriya, J., et Kurabayashi, M.** (2004). Interleukin-6-induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes. *J Int Med Res* *32*, 57-61.
- Tandon, N., Dinsdale, C., Tamatani, T., Miyasaka, M., et Weetman, A.P.** (1991). Adhesion molecule expression by the FRTL-5 rat thyroid cell line. *J Endocrinol* *130*, 451-456.
- Terrell, A.M., Crisostomo, P.R., Wairiuko, G.M., Wang, M., Morrell, E.D., et Meldrum, D.R.** (2006). Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* *26*, 226-234.
- Terzic, A., Puceat, M., Vassort, G., et Vogel, S.M.** (1993). Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* *45*, 147-175.
- Thabard, W., Barille, S., Collette, M., Harousseau, J.L., Rapp, M.J., Bataille, R., et Amiot, M.** (1999). Myeloma cells release soluble interleukin-6Ralpha in relation to disease progression by two distinct mechanisms: alternative splicing and proteolytic cleavage. *Clin Cancer Res* *5*, 2693-2697.
- Thiel, S., Behrmann, I., Dittrich, E., Muys, L., Tavernier, J., Wijdenes, J., Heinrich, P.C., et Graeve, L.** (1998). Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem J* *330 (Pt 1)*, 47-54.
- Thorburn, J., Carlson, M., Mansour, S.J., Chien, K.R., Ahn, N.G., et Thorburn, A.** (1995). Inhibition of a signaling pathway in cardiac muscle cells by active mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Biol Cell* *6*, 1479-1490.
- Tian, Z.J., Cui, W., Li, Y.J., Hao, Y.M., Du, J., Liu, F., Zhang, H., Zu, X.G., Liu, S.Y., Chen, L., et coll.** (2004). Different contributions of STAT3, ERK1/2, and PI3-K signaling to cardiomyocyte hypertrophy by cardiotrophin-1. *Acta Pharmacol Sin* *25*, 1157-1164.
- Timmermann, A., Pflanz, S., Grotzinger, J., Kuster, A., Kurth, I., Pitard, V., Heinrich, P.C., et Muller-Newen, G.** (2000). Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor. *FEBS Lett* *468*, 120-124.
- Tominaga, T., Yamashita, S., Nagayama, Y., Morita, S., Yokoyama, N., Izumi, M., et Nagataki, S.** (1991). Interleukin 6 inhibits human thyroid peroxidase gene expression. *Acta Endocrinol (Copenh)* *124*, 290-294.
- Tomita, H., Nazmy, M., Kajimoto, K., Yehia, G., Molina, C.A., et Sadoshima, J.** (2003). Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res* *93*, 12-22.
- Tramontano, D., Chin, W.W., Moses, A.C., et Ingbar, S.H.** (1986). Thyrotropin and dibutyryl cyclic AMP increase levels of c-myc and c-fos mRNAs in cultured rat thyroid cells. *J Biol Chem* *261*, 3919-3922.
- Trovato, M., Grosso, M., Vitarelli, E., Ruggeri, R.M., Alesci, S., Trimarchi, F., Barresi, G., et Benvenga, S.** (2003). Distinctive expression of STAT3 in papillary thyroid carcinomas and a subset of follicular adenomas. *Histol Histopathol* *18*, 393-399.

- Tsuji, F., Oki, K., Senda, T., Horiuchi, M., et Mita, S.** (1999). Effects of mitogen-activated protein kinase inhibitors or phosphodiesterase inhibitors on interleukin-1-induced cytokines production in synovium-derived cells. *Immunol Lett* 68, 275-279.
- Tsygankova, O.M., Saavedra, A., Rebhun, J.F., Quilliam, L.A., et Meinkoth, J.L.** (2001). Coordinated regulation of Rap1 and thyroid differentiation by cyclic AMP and protein kinase A. *Mol Cell Biol* 21, 1921-1929.
- Van Keymeulen, A., Dumont, J.E., et Roger, P.P.** (2000). TSH induces insulin receptors that mediate insulin costimulation of growth in normal human thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 202-207.
- Van Sande, J., Mockel, J., Boeynaems, J.M., Dor, P., Andry, G., et Dumont, J.E.** (1980). Regulation of cyclic nucleotide and prostaglandin formation in normal human thyroid tissue and in autonomous nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 50, 776-785.
- Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Fiers, W., et Haegeman, G.** (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273, 3285-3290.
- Vanvooren, V., Allgeier, A., Cosson, E., Van Sande, J., Defer, N., Pirlot, M., Hanoune, J., et Dumont, J.E.** (2000). Expression of multiple adenylyl cyclase isoforms in human and dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 170, 185-196.
- Virion, A., Michot, J.L., Deme, D., Kaniewski, J., et Pommier, J.** (1984). NADPH-dependent H₂O₂ generation and peroxidase activity in thyroid particulate fraction. *Mol Cell Endocrinol* 36, 95-105.
- Vitti, P., Rotella, C.M., Valente, W.A., Cohen, J., Aloj, S.M., Laccetti, P., Ambesi-Impiombato, F.S., Grollman, E.F., Pinchera, A., Toccafondi, R., et coll.** (1983). Characterization of the optimal stimulatory effects of graves' monoclonal and serum immunoglobulin G on adenosine 3',5'-monophosphate production in fRTL-5 thyroid cells: a potential clinical assay. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 782-791.
- Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M., et Rose-John, S.** (1999). A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding. *Eur J Biochem* 263, 438-446.
- Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G.M., et Brewer, G.** (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48, 195-202.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P., et Krebs, E.G.** (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243, 3763-3765.
- Wang, X.Z., et Ron, D.** (1996). Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272, 1347-1349.
- Ward, L.D., Hammacher, A., Howlett, G.J., Matthews, J.M., Fabri, L., Moritz, R.L., Nice, E.C., Weinstock, J., et Simpson, R.J.** (1996). Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex. *J Biol Chem* 271, 20138-20144.
- Ward, L.D., Howlett, G.J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R.L., et Simpson, R.J.** (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 269, 23286-23289.
- Watson, P.F., Pickerill, A.P., Davies, R., et Weetman, A.P.** (1994). Analysis of cytokine gene expression in Graves' disease and multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 355-360.
- Watson, P.F., Pickerill, A.P., Davies, R., et Weetman, A.P.** (1995). Semi-quantitative analysis of interleukin-1 alpha, interleukin-6 and interleukin-8 mRNA expression by human thyrocytes. *J Mol Endocrinol* 15, 11-21.

- Weber, K.T., Jalil, J.E., Janicki, J.S., et Pick, R.** (1989). Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease. *Am J Hypertens* 2, 931-940.
- Weetman, A.P., Bright-Thomas, R., et Freeman, M.** (1990). Regulation of interleukin-6 release by human thyrocytes. *J Endocrinol* 127, 357-361.
- Weetman, A.P., Cohen, S., Makgoba, M.W., et Borysiewicz, L.K.** (1989). Expression of an intercellular adhesion molecule, ICAM-1, by human thyroid cells. *J Endocrinol* 122, 185-191.
- Weetman, A.P., et McGregor, A.M.** (1994). Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 15, 788-830.
- Wegiel, B., Bjartell, A., Culig, Z., et Persson, J.L.** (2008). Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 122, 1521-1529.
- Weinstein, L.S., Shenker, A., Gejman, P.V., Merino, M.J., Friedman, E., et Spiegel, A.M.** (1991). Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 325, 1688-1695.
- Weiss, T.W., Speidl, W.S., Kaun, C., Rega, G., Springer, C., Macfelda, K., Losert, U.M., Grant, S.L., Marro, M.L., Rhodes, A.D., et coll.** (2003). Glycoprotein 130 ligand oncostatin-M induces expression of vascular endothelial growth factor in human adult cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 59, 628-638.
- Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., Xu, J., Plank, D.M., Jones, F., Kimball, T.R., et Molkentin, J.D.** (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 94, 110-118.
- Wilson, G.M., Lu, J., Sutphen, K., Suarez, Y., Sinha, S., Brewer, B., Villanueva-Feliciano, E.C., Ysla, R.M., Charles, S., et Brewer, G.** (2003). Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J Biol Chem* 278, 33039-33048.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K., et Holtmann, H.** (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* 18, 4969-4980.
- Witowski, J., Jorres, A., Coles, G.A., Williams, J.D., et Topley, N.** (1996). Superinduction of IL-6 synthesis in human peritoneal mesothelial cells is related to the induction and stabilization of IL-6 mRNA. *Kidney Int* 50, 1212-1223.
- Wollert, K.C., et Drexler, H.** (2001). The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev* 6, 95-103.
- Woodcock, E.A., Du, X.J., Reichelt, M.E., et Graham, R.M.** (2008). Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res* 77, 452-462.
- Xiao, R.P., Zhu, W., Zheng, M., Cao, C., Zhang, Y., Lakatta, E.G., et Han, Q.** (2006). Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci* 27, 330-337.
- Xu, N., Chen, C.Y., et Shyu, A.B.** (2001). Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 21, 6960-6971.
- Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., et Kishimoto, T.** (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241, 825-828.
- Yamashita, S., Kimura, H., Ashizawa, K., Nagayama, Y., Hirayu, H., Izumi, M., et Nagataki, S.** (1989). Interleukin-1 inhibits thyrotrophin-induced human thyroglobulin gene expression. *J Endocrinol* 122, 177-183.
- Yamauchi-Takahara, K., Ihara, Y., Ogata, A., Yoshizaki, K., Azuma, J., et Kishimoto, T.** (1995). Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 91, 1520-1524.

- Yan, S.F., Tritto, I., Pinsky, D., Liao, H., Huang, J., Fuller, G., Brett, J., May, L., et Stern, D.** (1995). Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J Biol Chem* *270*, 11463-11471.
- Yang, S., Hu, S., Choudhry, M.A., Rue, L.W., 3rd, Bland, K.I., et Chaudry, I.H.** (2007). Anti-rat soluble IL-6 receptor antibody down-regulates cardiac IL-6 and improves cardiac function following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol* *42*, 620-630.
- Yang, S., Hu, S., Hsieh, Y.C., Choudhry, M.A., Rue, L.W., 3rd, Bland, K.I., et Chaudry, I.H.** (2006). Mechanism of IL-6-mediated cardiac dysfunction following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol* *40*, 570-579.
- Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S., et Kishimoto, T.** (1987). Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* *6*, 2939-2945.
- Yasukawa, K., Saito, T., Fukunaga, T., Sekimori, Y., Koishihara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y., Matsuda, T., Yawata, H., Hirano, T., et coll.** (1990). Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J Biochem* *108*, 673-676.
- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T., et Kishimoto, T.** (1993). Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J* *12*, 1705-1712.
- Ye, K., Koch, K.C., Clark, B.D., et Dinarello, C.A.** (1992). Interleukin-1 down-regulates gene and surface expression of interleukin-1 receptor type I by destabilizing its mRNA whereas interleukin-2 increases its expression. *Immunology* *75*, 427-434.
- Yee, C.S., Messner, H.A., et Minden, M.D.** (1991). Regulation of interleukin-6 expression in the lymphoma cell line OCI-LY3. *J Cell Physiol* *148*, 426-429.
- Yeoh, G.C., Ernst, M., Rose-John, S., Akhurst, B., Payne, C., Long, S., Alexander, W., Croker, B., Grail, D., et Matthews, V.B.** (2007). Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology* *45*, 486-494.
- Yin, F., Wang, Y.Y., Du, J.H., Li, C., Lu, Z.Z., Han, C., et Zhang, Y.Y.** (2006). Noncanonical cAMP pathway and p38 MAPK mediate beta2-adrenergic receptor-induced IL-6 production in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* *40*, 384-393.
- Yoshida, A., Asaga, T., Masuzawa, C., Kawahara, S., Yanoma, S., Harada, M., et Okamoto, T.** (1994). Production of cytokines by thyroid carcinoma cell lines. *J Surg Oncol* *55*, 104-107.
- Youker, K., Smith, C.W., Anderson, D.C., Miller, D., Michael, L.H., Rossen, R.D., et Entman, M.L.** (1992). Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* *89*, 602-609.
- Yu, X.W., Chen, Q., Kennedy, R.H., et Liu, S.J.** (2005a). Inhibition of sarcoplasmic reticular function by chronic interleukin-6 exposure via iNOS in adult ventricular myocytes. *J Physiol* *566*, 327-340.
- Yu, X.W., Liu, M.Y., Kennedy, R.H., et Liu, S.J.** (2005b). Both cGMP and peroxynitrite mediate chronic interleukin-6-induced negative inotropy in adult rat ventricular myocytes. *J Physiol* *566*, 341-353.
- Zakarija, M., et McKenzie, J.M.** (1989). Influence of cytokines on growth and differentiated function of FRTL5 cells. *Endocrinology* *125*, 1260-1265.
- Zhang, Y., Broser, M., et Rom, W.N.** (1994). Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2225-2229.

Zhang, Y., Lin, J.X., et Vilcek, J. (1988). Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J Biol Chem* 263, 6177-6182.

Zhang, Y.H., Lin, J.X., et Vilcek, J. (1990). Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol* 10, 3818-3823.

Zheng, R.Q., Abney, E., Chu, C.Q., Field, M., Grubeck-Loebenstein, B., Maini, R.N., et Feldmann, M. (1991). Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemical methods. *Clin Exp Immunol* 83, 314-319.

Zohlhofer, D., Graeve, L., Rose-John, S., Schooltink, H., Dittrich, E., et Heinrich, P.C. (1992). The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett* 306, 219-222.