

De la membrane au noyau, un couplage direct entre des récepteurs de cytokines et la machinerie transcriptionnelle

En 1992, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de transmission des signaux extracellulaires aux machineries intracellulaires, notamment à la machinerie transcriptionnelle. Les deux progrès les plus significatifs concernent l'intervention des petites protéines G de la famille Ras dans la transmission des signaux passant par des récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance, dotés ou non d'une activité de tyrosine kinase (*m/s n° 5, vol. 8, p. 471 et n° 10, vol. 8, p. 1095*). Un autre coup de tonnerre fut la démonstration qu'un chemin beaucoup plus direct pouvait être emprunté entre la membrane et le noyau, illustré par le mode d'action des interférons α , β et γ (*m/s n° 8, vol. 8, p. 838*). Dans ce dernier cas, la liaison des interférons à leurs récepteurs aboutit, par l'intermédiaire de tyrosine kinases cytosoliques, à la phosphorylation de facteurs de transcription qui, ainsi activés, pénètrent dans le noyau, se fixent à leur séquence cible et stimulent la transcription des gènes répondant aux interférons. En 1993, les différentes étapes du signal passant par Ras ont été mieux décrites, les différents partenaires agissant entre le récepteur et la machinerie transcriptionnelle étant maintenant bien caractérisés (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1126*). Cependant, c'est principalement le domaine de l'activation directe de facteurs transcriptionnels par des tyrosine kinases qui a explosé, tout spécialement durant le quatrième trimestre de l'année 1993 et au début de 1994. Les résultats obtenus

l'ont été grâce à l'utilisation ingénieuse de méthodes de génétique somatique (c'est-à-dire à l'emploi de lignées mutantes de cellules somatiques en culture) et de biochimie.

La transmission du signal des interférons nécessite l'intervention de deux tyrosine kinases

Une équipe dirigée par IM Kerr, à Londres (GB) a utilisé, pour élucider les intermédiaires de la transmission du signal de l'interféron, le type de stratégie qui lui avait permis de démontrer l'intervention de la tyrosine kinase Tyk2 dans les effets biologiques de l'interféron α (*m/s n° 8, vol. 8, p. 838*), l'emploi de lignées de cellules mutantes ne répondant plus aux interférons. Une lignée incapable de répondre aux interférons α/β et γ s'est révélée être déficiente en la tyrosine kinase Jak1 [1], alors qu'une lignée déficiente pour la réponse à l'interféron γ mais normalement stimulée par l'interféron α était déficiente en la tyrosine kinase Jak2 [2]. La transmission du signal provoqué par l'interféron α nécessitant aussi la présence de la tyrosine kinase Tyk2, ces résultats indiquent que l'effet des interférons requiert la présence de deux tyrosine kinases cytoplasmiques, Jak1 et Tyk2 pour l'interféron α , Jak1 et Jak2 pour l'interféron γ . Une seule de ces tyrosine kinases est incapable de permettre la transmission du signal. Jak1 est commune aux voies de transmission des signaux des interférons α/β et γ . La nécessité d'une coopération entre deux tyrosine kinases différentes dans la trans-

mission de ces signaux pourrait être expliquée par plusieurs phénomènes. Les tyrosine kinases ont besoin, pour être activées, d'être elles-mêmes phosphorylées sur des résidus tyrosine. Il se pourrait que cette phosphorylation ne fût pas une auto-phosphorylation, mais le résultat de l'action l'une sur l'autre des deux tyrosine kinases de chaque couple. Par ailleurs, il semble que la présence des deux tyrosine kinases soit indispensable à l'édification d'un récepteur fonctionnel pour les interférons. En présence d'une seule d'entre elles, le signal pourrait être interrompu à l'origine, au niveau d'un complexe-récepteur incomplet.

Les protéine kinases de la famille Jak/Tyk induisent la phosphorylation sur des tyrosines de facteurs de transcription Stat

Nous avons déjà vu que la stimulation par l'interféron α ou β entraînait la phosphorylation sur des résidus tyrosine des différentes sous-unités du facteur ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*), p113 et p91/p84 (*m/s n° 8, vol. 8, p. 838*). Les protéines p84 et p91 sont issues de l'épissage différentiel du transcrite d'un même gène; il manque à p84 38 acides aminés carboxy-terminaux qui pourraient intervenir dans la stimulation transcriptionnelle. Ces facteurs phosphorylés migrent dans le noyau où ils s'associent à p48 pour former un complexe d'activation transcriptionnelle au niveau de l'élément d'ADN ISRE (*interferon-stimulated response element*). Le traitement par l'interféron γ n'entraîne la

phosphorylation que de p91 qui se fixe à l'élément d'ADN GAS (*γ* *interferon-activated sequence*), situé en amont des gènes stimulés par l'interféron γ . L'équipe de James Darnell propose de dénommer ces protéines p91 et p113 des Stat, pour *signal transducers and activators of transcription* [3]. Jak1 et Jak2, préalablement activés à la suite de la liaison de l'interféron γ à son récepteur, sont toutes deux indispensables à la phosphorylation de Stat91 sur la tyrosine 701. Symétriquement, la phosphorylation de Stat113 requiert la présence, à la fois, de Jak1 et de Tyk2 [3, 4].

Des voies communes de transmission des signaux existent pour les interférons et d'autres cytokines ou facteurs de croissance

La protéine kinase Jak2, indispensable à la transmission du signal de l'interféron γ , est également impliquée dans la transmission des signaux de l'érythropoïétine [5], de l'interleukine 3 [6], et de l'hormone de croissance [7]. Si la règle prévalant à la transmission des signaux des interférons vaut également pour ces cytokines, Jak2 doit coopérer avec une autre tyrosine kinase qui n'a pas encore été identifiée. De

même, les facteurs de type Stat, impliqués dans ces voies de transmission du signal, ne sont pas identifiés; les protéines Stat91 et Stat113 ne sont pas phosphorylées lors du traitement des cellules par l'érythropoïétine, l'interleukine-3 ou l'hormone de croissance.

En revanche, Stat91 est l'un des facteurs transcriptionnels activés lors de la stimulation des cellules par EGF et PDGF (*epidermal growth factor* et *platelet derived growth factor*). Ces facteurs stimulent, notamment, la transcription du gène *c-fos* en agissant au niveau d'un élément d'ADN SIE (*Sis-inducible element*) localisé une tren-

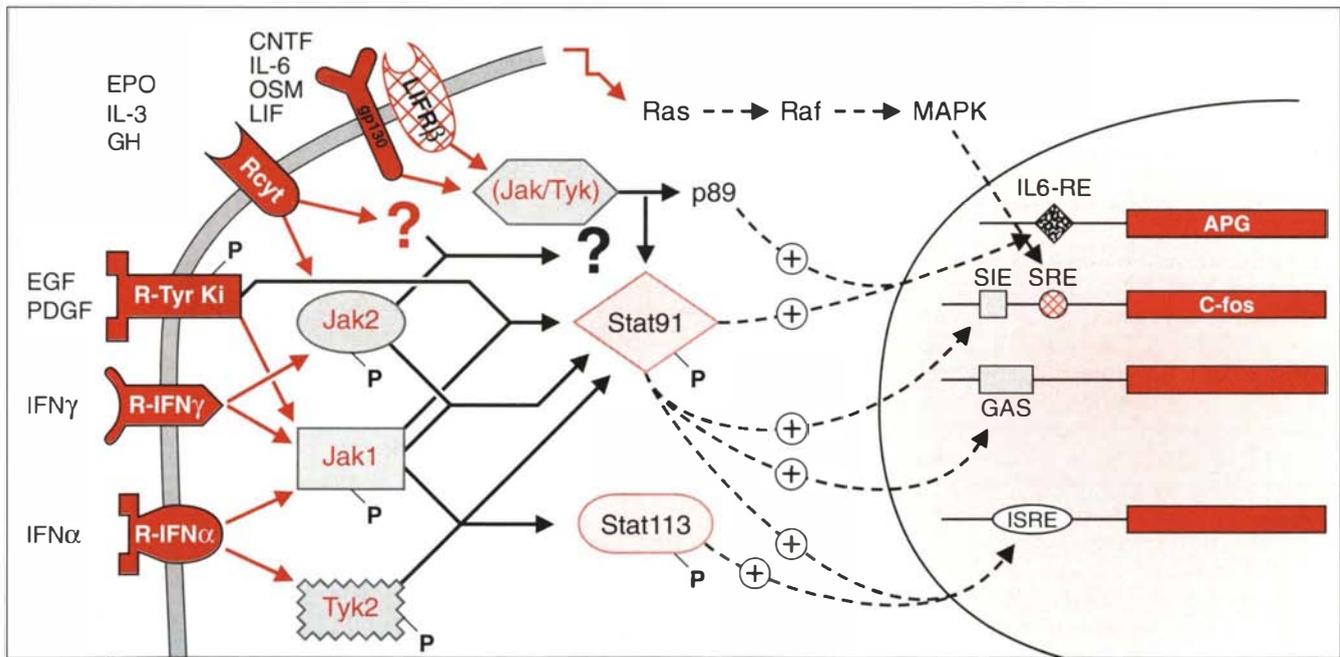


Figure 1. **Schéma de la transmission des signaux des interférons, de facteurs de croissance et de cytokines.** En rouge, les tyrosine kinases cytoplasmiques impliquées dans la transmission du signal passant par différents récepteurs. En traits noirs continus, les facteurs de transcription cytoplasmiques phosphorylés par l'action combinée de deux de ces tyrosine kinases. Dans le cas du récepteur de l'EGF, la coopération se fait probablement entre Jak1 et l'activité tyrosine kinasique intrinsèque du récepteur. Dans le cas des récepteurs (R-tyr pour récepteurs de cytokines) de l'érythropoïétine (EPO), de l'hormone de croissance (GH) et de l'interleukine-3 (IL3), les partenaires éventuels de Jak2 et leurs cibles sont inconnus. Les récepteurs pour les facteurs de la famille CNTF (CNTF, IL6, oncostatine M et LIF) ont en commun la gp130 et, pour CNTF, OSM et LIF, la sous-unité LIFR β . Ces sous-unités de récepteurs interagissent avec diverses tyrosine kinases de la famille Jak/Tyr. Les lignes discontinues indiquent les effets des facteurs Stat (signal transducers and activators of transcription) sur différentes cibles d'ADN: IL6-RE (IL6 response elements), SIE (Sis-inducible element), GAS (gamma interferon-activated sequence) et ISRE (interferon-stimulated response element). Les lettres P indiquent la phosphorylation de résidus tyrosine, notamment la tyrosine 701 dans le cas de Stat91. Le gène *c-Fos* possède également l'élément SRE (serum response element) sur lequel se fixe le complexe p67^{SRF} et p62^{TCF}. p62^{TCF} est un facteur de transcription de la famille Ets, dénommé Elk1, qui est activé par phosphorylation catalysée par les MAP kinases. Par conséquent, l'élément SRE est la cible de la voie de transmission du signal passant par des récepteurs de facteurs de croissance ou de cytokines, Ras, Raf et les MAP kinases. APG: acute phase gene, répondant à IL6.

taine de bases en amont de l'élément SRE (*serum response element*). SIE fixe le facteur SIF (*Sis-inducible factor*). La séquence de l'élément SIE est très voisine de celle de l'élément GAS conférant la réponse à l'interféron γ . De plus, parmi les protéines capables de se fixer à SIE, l'une d'entre elles est incontestablement Stat91 [8-12]. Stat91 pourrait également être impliquée dans la transmission du signal d'autres cytokines, notamment de l'interleukine-6 au niveau des cellules hépatiques [9], et de l'interleukine-10 [13]. En réalité, différentes cytokines semblent activer différentes combinaisons de facteurs de transcription ayant des préférences de fixation pour des éléments d'ADN de la famille GAS/SIE [8, 11, 13], permettant d'expliquer, tout à la fois, le recouvrement et la spécificité des actions des différentes cytokines et des facteurs de croissance.

La triple combinatoire des récepteurs de cytokines, des tyrosine kinases et des facteurs de transcription

La transmission des signaux issus des facteurs CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), OSM (*oncostatin M*), LIF (*leukemia inhibitory factor*) et IL6 (interleukine-6) illustre particulièrement bien comment peut être engendrée de la diversité de réponse biologique par l'utilisation de combinaisons variées d'un petit nombre de composants, dont aucun n'est spécifique d'un signal donné. Nous avons déjà vu que les récepteurs de CNTF, OSM, LIF et IL6 partagent une sous-unité commune, gp130, homodimérisée (IL6) ou hétérodimérisée avec une sous-unité LIFR β commune aux récepteurs de LIF, OSM et CNTF (*m/s n° 5, vol. 8, p. 490*). De plus, un déterminant supplémentaire de spécificité est indispensable en ce qui concerne IL6 (IL6R α) et CNTF (CNTFR α) [12]. Une équipe multinationale, américaine (Tarrytown, NY et Memphis, TN), et française (Institut Pasteur de Paris), vient de démontrer que les régions cytoplasmiques de gp130 et LIFR β , partiellement homologues, forment un complexe avec diverses tyrosine kinases de la famille Jak/Tyk [12]. La stimulation

par les diverses cytokines de la famille CNTF/IL6 induit la phosphorylation de tyrosine kinases différentes dans différentes lignées cellulaires: Jak1 et Jak2 (cellules EW-1), ou bien Jak2 et un faible niveau de Jak1 et Tyk2 (cellules SK-MES), ou encore Jak1 et Tyk2 (cellules U266).

Dans les cellules hépatomateuses différenciées en culture, IL6 est l'une des cytokines essentielles de l'activation des gènes de « la phase aiguë » (*acute phase*) de l'inflammation. Elle induit la phosphorylation de Jak1 et Tyk2 (comme dans les cellules U266), et de deux facteurs de transcription, Stat91 (comme indiqué ci-dessus) et APRF (*acute phase response factor*), une protéine de 89 kDa qui se fixe à l'élément d'ADN conférant la réponse transcriptionnelle à IL6 (IL6-RE). APRF est immunologiquement relié à Stat91 et IL6-RE est assez similaire à GAS [14]. L'équipe, particulièrement internationale (Aix-la-Chapelle et Martinsried en Allemagne; New York, NY, USA; Berne, Suisse; Victoria, Australie; Kanagawa et Osaka, Japon; Paris), responsable de ce travail propose également un schéma où la tyrosine kinase Jak1 est en permanence associée au récepteur gp130; la liaison du ligand IL6 à ce dernier entraîne, peut-être par l'intermédiaire d'une oligomérisation des sous-unités du récepteur, la phosphorylation des tyrosine kinases, principalement Jak1 et, à un moindre degré, Tyk2. APRF interagit alors avec le complexe kinase-récepteur activé, et est phosphorylé sur une tyrosine, ce qui conduit à son passage dans le noyau et à l'activation des gènes de l'*acute phase* possédant un élément de type IL6-RE dans leur région régulatrice. D'autres cytokines entraîneraient l'oligomérisation de gp130 avec la sous-unité LIFR β dont le domaine cytoplasmique peut interagir avec des kinases légèrement différentes de celles liées à gp130, ce qui peut engendrer un signal différent de celui déclenché par IL6 [14].

Des cascades de phosphorylations

La figure 1 schématise les connaissances actuelles de la transmission directe du signal entre des récep-

teurs de facteurs de croissance ou de cytokines et le noyau, par l'intermédiaire de la phosphorylation de facteurs de transmission cytoplasmiques, dirigés ainsi vers le noyau et vers leur cible d'ADN. Dans les voies les mieux caractérisées, celles passant par les récepteurs de l'interféron α ou β , de l'interféron γ et des facteurs de croissance EGF et PDGF, la liaison du ligand à son récepteur aboutit à l'activation de deux tyrosine kinases: Jak1 et Tyk2, dans le cas de l'interféron α , Jak1 et Jak2 dans le cas de l'interféron γ , Jak1 et l'activité tyrosine kinase propre du récepteur dans le cas de l'EGF. La coopération entre Jak1 et Jak2 activés aboutit à la phosphorylation prédominante de Stat91. Jak1 semble donc être un intermédiaire indispensable (mais non suffisant) à cette phosphorylation de Stat91 sur sa tyrosine 701. En coopération avec l'activité intrinsèque tyrosine kinase du récepteur de l'EGF, Jak1 activé induit, en outre, la phosphorylation d'autres facteurs susceptibles de se fixer sur les éléments SIE [9, 11, 15]. Ces complexes ne contenant pas Stat91 semblent avoir plus d'affinités pour l'élément SIE que pour les éléments GAS. En coopération avec Tyk2 activé, Jak1 phosphorylé aboutit à l'activation de Stat113, sous-unité, avec Stat91/84, du facteur IGF3. Cette phosphorylation en cascade semble impliquer, pour certaines étapes, des domaines protéiques de type SH2 (*Src homology domain 2*). En effet, la mutation du domaine SH2 de Stat91 supprime sa phosphorylation en réponse à un traitement par l'interféron γ ou par l'EGF, et conduit à la suppression de la transmission du signal de ces cytokines [3].

Les cytokines de la famille CNTF/IL6 mettent également en jeu une coopération entre plusieurs tyrosine kinases de la famille Jak/Tyk, en des combinaisons variées selon les types cellulaires [12]. Dans les cellules hépatiques, cela aboutit à la phosphorylation de Stat91 et d'un autre facteur de la même famille, APRF [14].

Les partenaires éventuels et les cibles de Jak2, stimulés lors de la liaison de l'érythropoïétine, de l'hormone de croissance ou de

l'interleukine-3 à leurs récepteurs, ne sont pas encore connus.

En conclusion, cette amélioration de notre compréhension des mécanismes de la transmission des signaux dans la cellule est probablement un des événements les plus importants de l'année 1993 en biologie. Rappelons-nous qu'il y a deux ans à peine, rien n'était connu de la nature des signaux envoyés par des récepteurs de cytokines ou de facteurs de croissance à la cellule. Maintenant nous savons qu'au moins deux voies de signalisation peuvent être empruntées: celle passant par les petites protéines G de la famille Ras, par Raf et par les MAP kinases; et la cascade des tyrosine kinases aboutissant à la phosphorylation activatrice de facteurs de transcription sur des tyrosines. La signification de chacun de ces signaux est imprimée par une combinatoire complexe utilisant des associations variées de protéines kinases, de facteurs de transcription et d'éléments de réponse aux spécificités voisines mais non identiques ■

RÉFÉRENCES

1. Müller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn B, Schindler C, Pellegrini S, Wilks AF, Ihle JN, Stark GR, Kerr I. The protein tyrosine kinase Jak1 complements defects in interferon- α/β and - γ signal transduction. *Nature* 1993; 366: 129-35.
2. Watling D, Guschin D, Müller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. Complementation by the protein tyrosine kinase Jak2 of a mutant cell line defective in the interferon- γ signal transduction pathway. *Nature* 1993; 366: 166-70.
3. Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 1993; 366: 580-2.
4. Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signaling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 1993; 366: 583-5.
5. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. Jak2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; 74: 227-36.
6. Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Cleveland JL, Yi T, Ihle JN. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8429-33.
7. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of Jak2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*; 74: 237-44.
8. Silvennoinen O, Schindler C, Schlessinger J, Levy DE. Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science* 1993; 261: 1736-7.
9. Sadowski HB, Shuai K, Darnell JE, Gilman MZ. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 1993; 261: 1739-43.
10. Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell Jr. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science* 1993; 261: 1744-6.
11. Fu XY, Zhang JJ. Transcription factor P91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation on the *c-fos* gene promoter. *Cell* 1993; 74: 1135-45.
12. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, Ihle JN, Yancopoulos GD. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science* 1994; 263: 92-5.
13. Larner AC, David M, Feldman GM, Igarashi K, Hackett RH, Webb DSA, Sweitzer SM, Petricoin III EF, Finbloom DS. Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. *Science* 1993; 261: 1730-3.
14. Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Barbieri G, Pellegrini S, Sendtner M, Heinrich PC, Horn F. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994; 263: 89-92.
15. Ruff-Jaminon S, Chen K, Cohen S. Induction by EGF and interferon- γ of tyrosine phosphorylated DNA binding proteins in mouse liver nuclei. *Science* 1993; 261: 1733-6.

Axel Kahn

Directeur de l'unité de recherches en génétique et pathologie moléculaires, Inserm U129. ICGM, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.