

Une nouvelle famille de cytokines inflammatoires

Les protéines SIS (*small induced secreted*) constituent une nouvelle famille de cytokines intervenant dans l'inflammation. Ces protéines ont environ 30 % d'homologie, et contiennent des résidus cystéine conservés. La famille peut être sous-divisée sur la base de deux de ces résidus cystéine qui sont soit adjacents (CC), soit séparés par un acide aminé (CXC). Les gènes de la classe CC se trouvent chez l'homme sur le chromosome 17 en q11-q21, alors que les gènes de la classe CXC se trouvent sur le chromosome 4 en q13-q21. Les protéines SIS sont induites par divers agents (lipopolysaccharide, esters de phorbol, cytokines tels l'IL-1 et le TNF) : l'induction par l'IL-1 intervenant aussi bien sur la transcription du gène, que sur la stabilité de l'ARNm. Produites par différentes cellules sanguines et tissulaires, les cytokines de la famille SIS ont en commun leur pouvoir chimiotactique, probablement responsable de l'accumulation des neutrophiles et des monocytes aux sites d'inflammation. Elles ont également de nombreuses autres actions sur la prolifération, la différenciation et l'activation fonctionnelle de cibles cellulaires variées. Les protéines SIS participent ainsi, avec d'autres cytokines, au réseau fonctionnel complexe de signaux déclenchant et contrôlant la réponse inflammatoire. Ces cytokines sont des cibles potentiellement importantes de médicaments à visée anti-inflammatoire.

Adrian J. Minty

ADRESSE

A.J. Minty : responsable de programme chez Sanofi-Elf biorecherches, docteur ès-sciences. Sanofi-Elf Biorecherches, Labège Innopole, 31328 Labège, France.

L'inflammation implique une communication intercellulaire intense comportant schématiquement trois étapes (figure 1). Les leucocytes sont attirés vers le site de l'agression par les facteurs chimiotactiques. Ils adhèrent à la paroi endothéliale à proximité de l'endroit de l'agression, ce qui nécessite la présence, sur la surface du leucocyte et de la cellule endothéliale, de molécules d'adhérence qui peuvent être induites par des facteurs diffusibles. Les leucocytes sont ensuite activés par divers agents pour accomplir leur rôle de défense. Parmi les facteurs responsa-

bles de l'adhérence, du chimiotactisme et de l'activation se trouvent des polypeptides sécrétés que nous appelons aujourd'hui les cytokines. Ces molécules agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs de haute affinité localisés à la surface de la cellule cible, induisant une multitude de réponses (prolifération, différenciation, activation, migration...). L'appellation cytokine a succédé à celles de lymphokine (protéine sécrétée par les lymphocytes T) et de monokine (protéine sécrétée par les monocytes) après la mise en évidence de la production de ces protéines par divers types cellu-

lares non leucocytaires. Les cytokines sont donc des médiateurs de la communication intercellulaire. Lorsque cette communication concerne deux cellules leucocytaires, elles prennent le nom d'interleukine (IL). Parmi les activités initialement attribuées à la première interleukine décrite (IL-1), on trouve une étape essentielle de l'inflammation : le chimiotactisme des neutrophiles qui fut mis en évidence *in vivo*, après injection à l'animal. En fait, *in vitro*, l'IL-1 n'a pas d'activité chimiotactique sur les neutrophiles, et son activité *in vivo* est le résultat de l'expression accrue d'une autre cytokine appelée initialement facteur chimiotactique des neutrophiles (*neutrophil chemotactic factor*) (NCF) ou peptide activant des neutrophiles (*neutrophil activating peptide 1*) (NAP1) [1], et maintenant couramment appelée IL-8 [2].

Dès la caractérisation de l'IL-8 par séquençage de la protéine en 1987 et

par clonage moléculaire en 1988 [3], il devint clair qu'elle était apparentée à d'autres protéines stockées dans les granules α des plaquettes : facteur 4 plaquettaire PF4 (*platelet factor 4*) et protéine basique plaquettaire PBP (*platelet basic protein*). Ces protéines sont présentes en grande quantité dans le sérum (15 à 20 $\mu\text{g/ml}$ après formation du caillot) et caractérisées depuis plus de dix ans. Au cours des trois dernières années, un nombre impressionnant de nouveaux membres de cette famille (*figure 2, p. 581*) ont été identifiés grâce essentiellement à deux techniques. D'une part, la purification de ces protéines et leur séquençage, qui se trouvent facilités par la petite taille et la nature chargée de ces molécules. D'autre part, le « criblage différentiel » de banques d'ADNc correspondant aux états activés et non activés des leucocytes, qui permet de cloner facilement des séquences codant pour ces cytokines, puisque, dans les leu-

cocytes activés, les ARNm correspondants peuvent atteindre jusqu'à 1 % des ARNm de la cellule [4].

L'ensemble des cytokines apparentées à l'IL-8 a été appelé la famille des protéines SIS pour *small induced secreted* (petites protéines induites sécrétées) [4]. Il peut être sous-divisé en deux classes sur la base de la présence de deux résidus cystéine conservés qui sont soit adjacents (CC) soit séparés par un acide aminé (CXC) (*figure 2*). Cette sous-division correspond aussi à une organisation au niveau du génome, puisque les gènes de la classe (CC) se trouvent chez l'homme sur le chromosome 17 en q11-q21, une région impliquée dans une leucémie promyélocytaire aiguë (AML-M3) [5], alors que les gènes de la classe (CXC) se trouvent sur le chromosome 4 en q13-q21 [5] (*figure 3, p. 582*). Les gènes de la classe (CC) comportent trois exons séparés par deux petits introns, alors que ceux de la classe (CXC) compor-

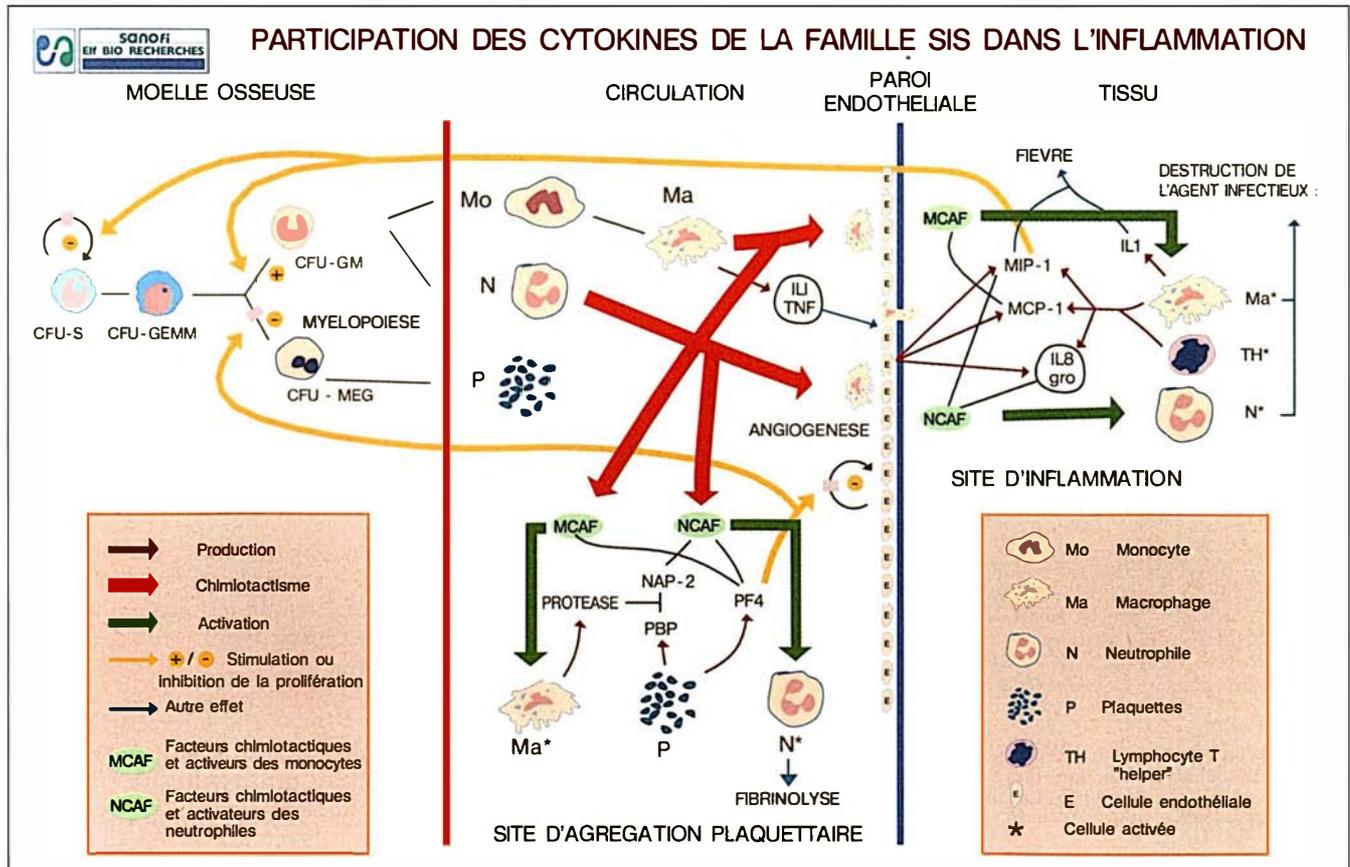


Figure 1. **Participation des protéines SIS à l'inflammation.** Quelques-unes des principales activités des protéines SIS sont indiquées. Les cellules de la moelle osseuse qui sont des précurseurs des leucocytes sont indiquées CFU, pour colony forming unit. CFU-S = cellule souche ; CFU-GEMM = granulocyte, érythrocyte, monocyte, mégacaryocyte ; CFU-GM = granulocyte, monocyte ; CFU-MEG = mégacaryocyte ; TNF = tumor necrosis factor.

RÉFÉRENCES

1. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, *et al.* Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 9233-7.
 2. Larsen CG, Anderson A, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989 ; 243 : 1464-6.
 3. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, *et al.* Molecular cloning of a monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1β and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988 ; 167 : 1883-93.
 4. Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol* 1989 ; 142 : 679-87.
 5. Irving SG, Zipfel PF, Balke J, *et al.* Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 3261-70.
 6. Sherry B, Cerami A. Small cytokine superfamily. *Curr Opin Immunol* 1991 ; 3 : 56-60.
 7. Gallin JI. Inflammation. In : Paul W, ed. *Fundamental Immunology*, 2nd ed. New York : Raven Press, 1989 : 721-33.
 8. Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M. The neutrophil-activating peptide NAF-NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 1787-92.
 9. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990 ; 171 : 1155-62.
 10. Gimbrone MA, Obin MS, Brock AF, *et al.* Endothelial interleukin 8 : a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 1989 ; 246 : 1601-3.
 11. Walz A, Baggiolini M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J Exp Med* 1990 ; 171 : 449-54.
- tent généralement quatre exons, séparés par trois petits introns (figure 3). L'homologie entre les protéines SIS, ainsi que les structures similaires de leurs gènes et le groupement de ces gènes au niveau du génome indiquent clairement l'évolution de ces protéines à partir d'un gène ancestral commun.
- Dans cet article, nous décrivons les différents membres de cette famille et leurs activités connues à ce jour. Ensuite, nous traiterons de quelques aspects de leur structure, de leur synthèse et de leur intérêt médical. Enfin, nous discuterons des questions posées par la redondance apparente de ces protéines, et de leurs interactions complexes au niveau des activités biologiques. Les caractéristiques de ces protéines, leurs sites de production et leurs activités sont résumés dans le *Tableau I*, p. 583. La nomenclature des protéines de cette famille reste très confuse. La protéine NCF-NAP-1 a été ainsi nommée interleukine 8 (IL-8) par Larsen *et al.* [2] sur la base d'une activité chimiotactique sur les lymphocytes T. L'appellation IL-8 ainsi que la signification de l'activité sur les lymphocytes T restent controversées. Les autres membres de la famille n'ont pas reçu une appellation interleukine, et plusieurs nomenclatures ont été proposées. Nous les décrivons sous le nom qui leur est le plus souvent attribué.

L'interleukine 8/NAP-1 : une cytokine inflammatoire et anti-inflammatoire

L'interleukine 8 est un agent chimiotactique et activateur des neutrophiles (*neutrophil activating protein 1* ou NAP-1). L'IL-8 paraît plus spécifique que d'autres facteurs chimiotactiques, comme les fragments du complément ou les leucotriènes, puisqu'elle n'a pas d'activité sur les monocytes. L'IL-8 est une cytokine inflammatoire par excellence puisque, outre son activité chimiotactique sur les neutrophiles, elle stimule leur dégranulation pour libérer des médiateurs de l'inflammation (activateurs du complément, lactoferrine...) et leur explosion oxydative (*oxydative burst*) conduisant à la production des radicaux oxygénés libres, nécessaires à la

bactéricidie [6]. L'importance de ces deux processus dans l'inflammation est soulignée par l'altération des défenses immunitaires dans deux anomalies congénitales : le syndrome Chediak-Higashi impliquant les granules des neutrophiles et la maladie granulomateuse chronique (*chronic granulomatous disease*) impliquant l'explosion oxydative [7]. La dégranulation des neutrophiles induite par l'IL-8 semble être importante pour inhiber la croissance de *Candida albicans* [6].

En outre, l'IL-8 stimule la libération d'histamine et des leucotriènes des basophiles préalablement stimulés par l'IL-3 [8] et elle augmente la quantité des molécules de surface CD11b/CD18 (constituant le récepteur du complément CR3) qui sont impliquées dans l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales [9]. Cependant, Gimbrone *et al.* [10] ont montré que les cellules endothéliales, une fois stimulées par l'IL-1, sécrètent un inhibiteur de leurs interactions avec les neutrophiles (*leucocyte adhesion inhibitor* ou LAI) qui correspond à la forme II de l'IL-8 (figure 4a, p. 584). L'IL-8 semblerait donc jouer un rôle dans le déclenchement d'un état inflammatoire, et ensuite un rôle anti-inflammatoire en protégeant la monocouche endothéliale contre une détérioration par les neutrophiles [10].

Les autres protéines SIS et leurs activités

PBP/NAP-2 : un activateur des neutrophiles produit par les plaquettes

Les granules α des plaquettes libèrent une protéine basique PBP (*platelet basic protein*) qui subit plusieurs étapes de maturation au niveau de son extrémité amino-terminale pour donner successivement le peptide III, activateur du tissu conjonctif ou CTAP-III (*connective tissue activating peptide-III*), puis la thromboglobuline- β (β -TG) et, enfin, la protéine 2 activateur des neutrophiles, NAP-2 (*neutrophil activating protein-2*) (figure 4a). Le dernier clivage nécessite l'activité de protéases produites par les monocytes [11] et permet la production de la forme la plus active (NAP-2 : forme VI, figure 4a). NAP-2 a des effets sur les neutrophiles similaires à la

		1					60
C C	MCP-1Mkv.saal	LclLLi.aat	fipqglaqpd	ainapvtC.C	ynftnrkIs.
	MIP1 αMqv.staa	La.vLLctma	lcn.qfsasl	aadtptaC.C	FsytsrqI.P
	MIP1 βMklc.vtv	LslLmL.vaa	fcspalsapm	gsdpptaC.C	Fsytarkl.P
	RantesMkv.saar	LaviLL.ata	lcapasaspy	ssdt.tpC.C	Fayiarpl.P
	I-309Mqi.itta	LvcLLL.agm	wpedvdsksm	qv.pfsrC.C	FsfaeqeI.P
	Consensus	-----	--M-----	L---LL----	-----P-	-----C.C	F-----P
CXC	Gro- α	...maraals	aapsnprllr	valLLlllva	agrrAagasv	ate..LRCqC	lqTlqg.iHP
	Gro- β	...maratls	aapsnprllr	valLLlllva	asrxAagapl	ate..LRCqC	lqTlqg.iHl
	Gro- γ	...mahatls	aapsnprllr	valLLlllva	asrrAagasv	vte..LRCqC	lqTlqg.iHl
	IL8m	ts.kl.aval	laafLi.saa	lcegAv.lpr	sake.LRCqC	ikTyskpfhP
	IP10mnq.tail	iccLif.ltl	..sgiqgvpl	srt..LRCtC	isisnqpvnP
	PBPss.tkgq	tkrnLa.kgk	..eesldsdl	yae..vRCmC	ikTtsq.iHP
	PF4	...mssaag	fcasrpgllf	lgLLlplvv	..afAsae.a	eedgDLqClC	vkTtsq.vrP
	PF4V	mssaarsrlt	ratrq.emlf	lalLLlplvv	..afArae.a	eedgDLqClC	vkTtsq.vrP
	Consensus	-----	-----	---LL-----	----A-----	-----LRC-C	--T-----P
		61					120
C.C	MCP-1	vqrlasYrri	.tSskCpkea	ViFkTiva..	keiCADPkqk	WVqdsmdhLd	kqtqt..pkt
	MIP1 α	qnfiadyfet	..SsqCskpg	ViFlTkrS..	rqvCADPsee	WVqkyvsdLe	lsa.....
	MIP1 β	rnfvvdYyet	..SslCsqa	VvFqTkrS..	kqvCADPses	WVqeyvydLe	ln.....
	Rantes	rahikeYfyt	..SgkCsnpa	VvFvTrkn..	rqvCANPekk	WVreiInsLe	ms.....
	I-309	lk.lkrgkeaCaldt	Vgwwqrhrkm	lrhC..Psk.	..rk.....
	Consensus	-----Y---	--S--C----	V-F-T-----	---CA-P---	WV-----L-	-----
CXC	Gro- α	kn.IqsvnVk	spGPHCaq.t	EvIATLKn.G	kKaCLnPasp	mvqKIiekiL	nkgstn....
	Gro- β	kn.Iqsvnvr	spGPHCaq.t	EvIATLKn.G	kKaCLnPasp	mvqKIiekiL	nkgstn....
	Gro- γ	kn.Iqsvnvr	spGPHCaq.t	EvIATLKn.G	kKaCLnPasp	mvqKIiekiL	nkgstn....
	IL8	k.fIkElrVi	esGPHCan.t	EiIvKlSd.G	relCLdPken	wvqrvvekfl	kraens....
	IP10	rs.lekleii	pasqfCpr.v	EiIATmKkkG	eKrCLnPesk	aiknllkavs	kemskrsp..
	PBP	kn.IqsleVi	gkGtHCnq.v	EvIATLkD.G	rKiCLdPdap	rikKIvqkkL	agdesad...
	PF4	r.hItsleVi	kaGPHCpt.a	qLIATLKn.G	rKiCLdlqap	lykKIikkL	es.....
	PF4V	r.hItsleVi	kaGPHCpt.a	qLIATLKn.G	rKiCLdlqal	lykKIikehL	es.....
	Consensus	---I----V-	--GPHC----	E-IATLK--G	-K-CL-P---	---KI----L	-----

Figure 2. **Comparaison des séquences d'acides aminés des protéines SIS humaines.** Les noms des protéines sont donnés dans le texte. PF4V est un variant de PF4. Les séquences ont été alignées pour maximaliser leur homologie, et elles sont numérotées à partir de la première méthionine du PF4V. Les protéines SIS sont regroupées en deux sous-familles (C.C et CXC) sur la base de deux résidus cystéine (position 48) qui sont : soit adjacents (C.C), soit séparés par un autre acide aminé (CXC). La forme III de l'IL-8 dont la structure est donnée dans la figure 4 débute par une sérine en position 41. La séquence est ici représentée par le code à une lettre. A = Ala ; D = Asp ; F = Phe ; H = His ; K = Lys ; M = Met ; P = Pro ; R = Arg ; T = Thr ; W = Trp ; C = Cys ; E = Glu ; G = Gly ; I = Ile ; L = Leu ; N = Asn ; Q = Gln ; S = Ser ; V = Val ; Y = Tyr.

RÉFÉRENCES

12. Richmond A, Balentien E, Thomas HG, *et al.* Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to β -thromboglobulin. *EMBO J* 1988 ; 7 : 2025-33.

13. Moser B, Clark-Lewis I, Zwahlen R, Baggiolini M. Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J Exp Med* 1990 ; 171 : 1797-802.

14. Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, *et al.* Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 911-9.

15. Haskill S, Peace A, Morris J, *et al.* Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 7732-6.

16. Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrichson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 4584-7.

17. Zucker MB, Katz IR, Thorbecke GJ, Milot DC, Holt J. Immunoregulatory activity of peptides related to platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7571-4.

18. Han ZC, Sensebe L, Abgrall JF, Briere J. Platelet factor 4 inhibits human megakaryocytopoiesis *in vitro*. *Blood* 1990 ; 76 : 1234-9.

19. Maione TE, Gray GS, Petro J, *et al.* Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor 4 and related peptides. *Science* 1990 ; 247 : 77-9.

20. Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, *et al.* Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988 ; 167 : 570-81.

21. Nakao M, Nomiya H, Shimada K. Structures of human genes coding for cytokine LD78 and their expression. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 3646-58.

22. Davatelis G, Wolpe SD, Sherry B, Dayer JM, Chicheportiche R, Cerami A. Macrophage inflammatory protein 1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* 1989 ; 243 : 1066-8.

23. Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, *et al.* Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation *in vitro* by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 1990 ; 76 : 1110-6.

Chromosome humain

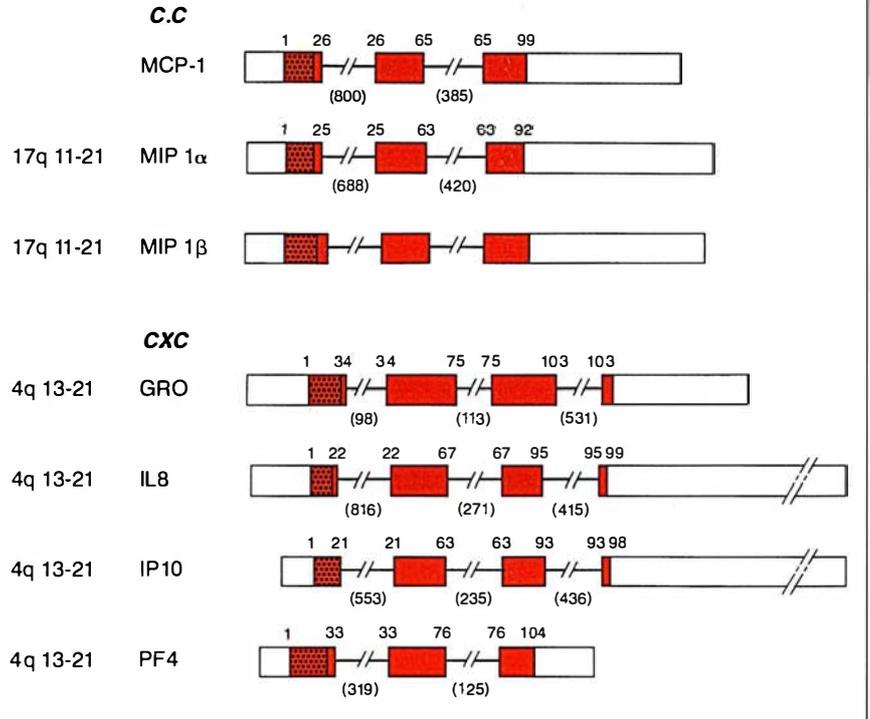


Figure 3. **Localisation chromosomique et structure exon-intron des gènes des protéines SIS humaines.** Les gènes SIS sont sous-divisés en deux classes, C.C et CXC (voir figure 2). Pour les détails et références des localisations chromosomiques des gènes SIS, voir Irving *et al.* [5]. Pour les détails et références des structures des gènes SIS, voir Nakao *et al.* [21]. Les exons (partie du gène présente dans l'ARN messager) sont indiqués par les boîtes et les introns (partie du gène transcrite, mais absente de l'ARNm) sont indiqués par les lignes. Les parties correspondant aux protéines matures sont indiquées par des boîtes rouges unies, et les peptides signaux par les boîtes rouges hachurées. Les chiffres au-dessus de chaque gène correspondent aux acides aminés de la protéine. Les tailles des introns sont notées entre parenthèses, sauf pour MIP1 β , où cette information n'est pas disponible.

ceux induits par IL-8/NAP-1 (voir Tableau I).

Gro/MGSA/NAP-3 : une cytokine analogue à l'IL-8

En 1987, Sager et ses collaborateurs isolaient un ADNc dont l'ARNm est très abondant dans les cellules tumorigènes de hamster (CHEF/16) mais très peu représenté dans les cellules non tumorigènes. Ils montraient que la transcription de ce gène est liée à la croissance de la cellule et ils l'appelèrent Gro pour *growth-regulated*. En 1988, Richmond *et al.* purifiaient et clonaient un facteur de croissance pour les mélanomes (MGSA, pour *melanoma growth stimulating activity*) qui s'avère être identique à Gro [12]. La protéine Gro a des activités inflam-

matoires sur les neutrophiles très semblables à celles de l'IL-8 [13] (Tableau I), et a donc été appelée NAP-3. La protéine Gro humaine est homologue à la protéine inflammatoire MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) de souris [14]. Depuis quelques mois, il est clair que les monocytes humains sécrètent deux autres protéines apparentées à Gro, appelées : Gro β et Gro γ [15], ou HMIP-2 α et HMIP-2 β [14] dont les rôles respectifs restent à établir.

PF4 (platelet factor 4) : une cytokine plaquettaire « pléiotrope »

PF4 est une protéine libérée sous forme complexée à la chondroïtine sulfatée par les granules α des plaquettes lors de leur agrégation.

Comme beaucoup de cytokines, elle a plusieurs activités biologiques (pléiotropisme) : chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des fibroblastes [16] ; prévention de l'immunosuppression induite par la concanavaline A chez la souris [17] ; inhibition de la mégacaryocytopoïèse [18] et inhibition de l'angiogénèse [19]. La dernière activité, qui dépend d'une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales, peut avoir des conséquences néfastes sur la cicatrisation, à l'inverse des effets inflammatoires de l'IL-8 et de Gro qui seraient plutôt bénéfiques. Cette activité anti-angiogénique pourra s'avé-

rer intéressante comme activité antitumorale (voir plus loin).

MIP1 (macrophage inflammatory protein-1), une protéine inflammatoire des macrophages

Deux protéines inflammatoires MIP1 (α et β) ont été isolées à partir de macrophages activés de souris sur la base de leur affinité pour l'héparine [20]. Chez l'homme, deux ADNc correspondant à des protéines homologues à 70 % avec MIP1 α et MIP1 β de la souris ont été identifiés par de nombreuses équipes et appelés de diverses façons : hMIP1 α (GOS-19, pAT464, LD78) et hMIP1 β (Act2, pAT744, G26, HC21, hH400) [5, 21].

L'activité des protéines MIP1 humaines n'a pas été décrite. Cependant, MIP1 α et MIP1 β de souris ont de nombreuses activités : pyrogénicité [22], chimiokinésie et activation de l'explosion oxydative des neutrophiles [20], stimulation de la formation des colonies CFU-GM (*colony forming units-granulocyte, macrophage*) à partir de cellules de la moelle osseuse [23], inhibition de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques CFU-S (*colony forming units-stem cells*) (MIP1 α et non MIP1 β) [23, 24].

Deux cytokines chimiotactiques pour les monocytes

La protéine 1 chimio-attractrice des

Tableau I
SOURCES CELLULAIRES ET ACTIVITÉS DES PROTÉINES SIS

Cytokine	Protéines (PM) ⁽¹⁾	Nombre acides aminés ⁽¹⁾	Glycosylation	Cellules ⁽²⁾ productrices	Protéine purifiée	ADNc cloné	Protéine recombinante	Activité chimiotactique ⁽³⁾	Activités sur neutrophiles ⁽⁴⁾ Explosion oxydative / Dégranulation	Autres activités
IL-8 (NCF, NAP-1)	8 kDa	72-79 (voir figure 4a)	-	M, E, N, (T) H, F, K, C, RPE, S	1987	1987	1988	N, T, Ba ³	++ +	• facteur de croissance kératinocytes • migration haptotactique mélanomes
Gro (MGSA, MIP-2, NAP-3) gro α , gro β , gro γ	8 kDa	71	-	M, E, N, (T), F	1990 (α)	1987 (α) 1990 (β , γ)	1990 (α)	N	+ +	• facteur de croissance mélanomes, fibroblastes
PBP (NAP-2, CTAP-III, β -TG)		70-86 (voir figure 4a)	-	P	1978	-	-	N	++ +	• facteur de croissance fibroblastes (nécessite concentrations élevées) • chimiotactisme des fibroblastes
PF4	8 kDa	70	-	P	1977	1987	1990	N, M	- +	• chimiotactisme des fibroblastes • inhibition mégacaryocytopoïèse • inhibition angiogénèse • prévention immunosuppression <i>in vivo</i>
MIP1 α : LD78, GOS19, pAT464 β : HC21, G26, hH400, Act2, pAT744	8 kDa	71	-	M, T, B, G, F, E	1987 (souris)	1988 (humain)	1990	N(+/-), T ³	+	• pyrogène • augmentation colonies CFU-GM • inhibition prolifération CFU-S (MIP1- α)
MCP-1 (MCAF)	11-17 kDa ⁽⁴⁾	76	O + N -	M, (T), B, F, S, K, L, LT	1989	1989	1990	M, Ba		• augmentation activité cytotatique des monocytes sur lignées tumorales
RANTES	8 kDa	68	-	T	-	1987	1990	M, T ³		

1. Le poids moléculaire et le nombre d'acides aminés sont donnés pour la protéine « mature », après clivage protéolytique sur du peptide signal. Le poids moléculaire apparent du MCP-1 est élevé à cause de sa glycosylation, et d'une migration aberrante sur gel [25].

2. Cellules productrices [6, 21, 34, 35, 39] : B, lymphocyte B ; C, chondrocyte ; E, cellule endothéliale ; F, fibroblaste ; G, gliome ; H, hépatocyte ; K, kératinocyte ; L, muscle lisse ; LT, lignée tumorale, M, monocyte ; P, plaquette ; RPE, cellule pigmentaire de la rétine ; S, cellule synoviale ; T, lymphocyte T. La liste n'est pas exhaustive. Par exemple, la synthèse de l'IL-8 a été recherchée beaucoup plus systématiquement que celle de Gro. La production de certaines de ces protéines par les lymphocytes T reste controversée.

3. Activité chimiotactique. N, neutrophile, M, monocyte ; T, lymphocyte T ; Ba, basophile. L'IL-8 a une activité chimiotactique sur toutes sortes de lymphocytes T. En revanche, RANTES agit sélectivement sur les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, CD45RO⁺ (mémoire) [26], et MIP1- β agirait plutôt sur les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺, CD45RA⁺ (naïve) (T. Schall, Keystone Symposium « Cytokines and their receptors », 1991). L'activité sur les neutrophiles est faible et il s'agit plutôt d'une chimiokinésie [20].

4. Explosion oxydative. Ces effets ne sont pas universellement admis et ils peuvent nécessiter l'addition d'un agent costimulateur (tels le GM-CSF ou la concanavaline A).

RÉFÉRENCES

24. Graham GJ, Wright EG, Hewick R, *et al.* Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 1990 ; 344 : 442-4.
25. Leonard E, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990 ; 11 : 97-101.
26. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990 ; 347 : 669-71.
27. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. γ -interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985 ; 315 : 672-6.
28. Miller MD, Hata S, De Waal Malefyt R, Krangel MS. A novel polypeptide secreted by activated human T lymphocytes. *J Immunol* 1989 ; 143 : 2907-16.
29. Hebert CA, Luscinskas FW, Kiely JM, *et al.* Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J Immunol* 1990 ; 145 : 3033-40.
30. Clore GM, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry* 1990 ; 29 : 1689-96.
31. St. Charles R, Walz DA, Edwards BFP. The three-dimensional structure of bovine platelet factor 4 at 3.0-Å resolution. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 2092-9.
32. Suzuki K, Yamakawa Y, Tuchiya HT, Mizuno S. Minimal peptide sequence for chemotactic activity of LUCT/IL-8. *Blood* 1990 ; 76 : 194a.
33. Van Damme J, Rampart M, Conings R, *et al.* The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and β -thromboglobulin : *in vitro* and *in vivo* comparison of NH₂-terminally processed forms. *Eur J Immunol* 1990 ; 20 : 2113-8.
34. Kunkel SL, Streiter RM, Chesne SW, *et al.* Tumor necrosis factor- α , interleukin 8 and chemotactic cytokines. Cytokines and lipocortins in inflammation and differentiation. New York : Wiley-Liss Inc, 1990 : 433-44.
35. Sica A, Wang JM, Colotta F, *et al.* Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990 ; 144 : 3034-8.

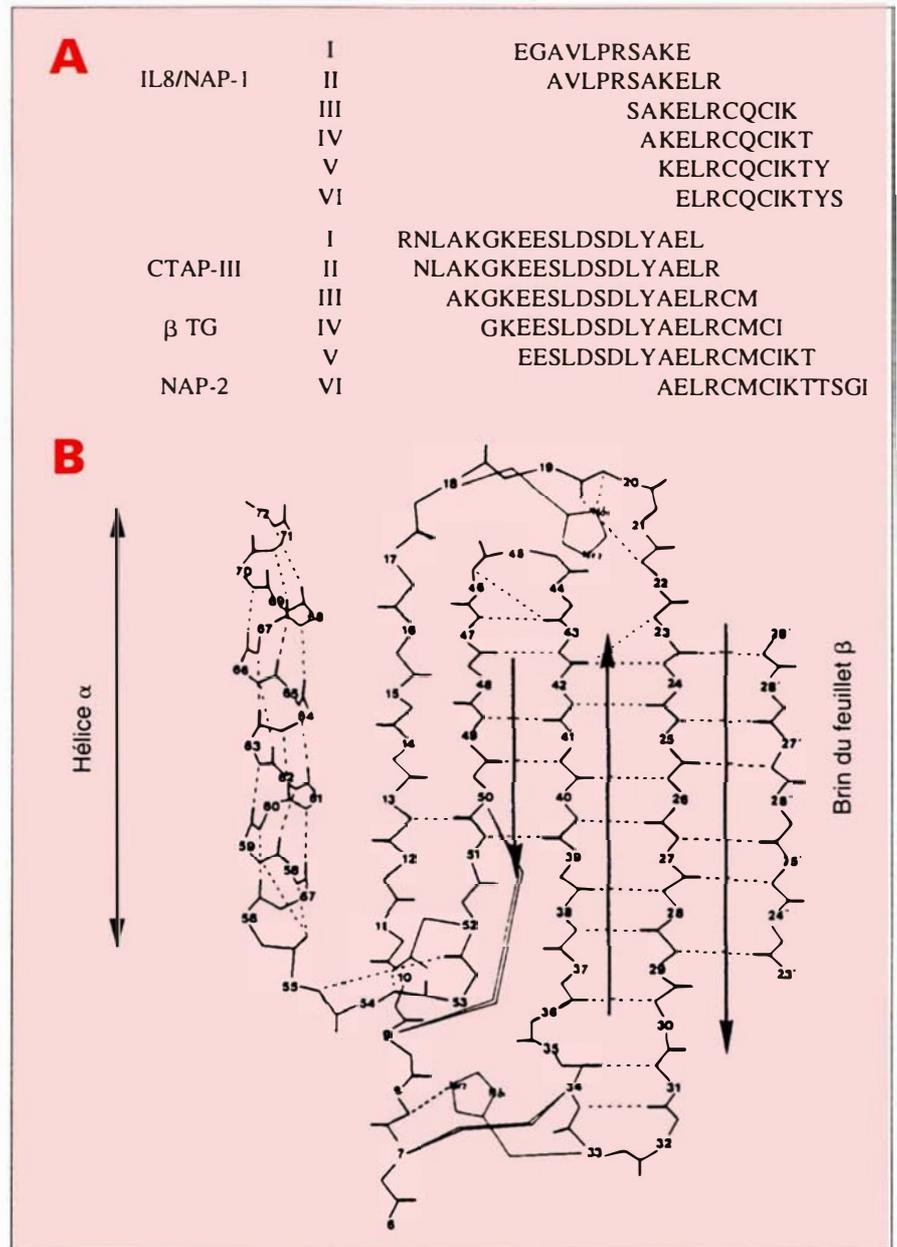


Figure 4. **Structure des protéines SIS. (A) Hétérogénéité des séquences amino-terminales de l'IL-8 et de la protéine PBP.** Les séquences amino-terminales des différentes formes de l'IL-8 et de la protéine basique des plaquettes (PBP pour platelet basic protein) sont indiquées [33]. Les noms des formes de PBP (CTAP-III, β -TG) sont donnés dans le texte. Toutes les formes de l'IL-8 (NAP-1) ont l'activité NAP (pour neutrophil activating protein), mais seule la forme VI de la PBP (NAP-2) possède cette activité [11]. La forme III de l'IL-8 est celle synthétisée de façon prépondérante par les monocytes, tandis que les cellules endothéliales produisent plutôt la forme II [29]. **(B) Représentation schématique de la structure de l'IL-8 d'après Clore et al. [30].** La structure tridimensionnelle en solution de la forme III de l'IL-8 a été déterminée par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) [30]. Les parties de la protéine formant des structures d'hélice α (\leftrightarrow) ou des brins de feuillet β (\rightarrow) sont indiquées. L'IL-8 existe sous forme de dimère. La figure illustre l'ensemble d'une sous-unité et les résidus 23 à 29 (indiqués 23' à 29') d'une deuxième sous-unité. Les liaisons hydrogènes sont indiquées en pointillés (- - -).

monocytes, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), était isolée en 1989 à partir d'une lignée de gliome et d'une lignée monocyttaire [25]. Elle a une activité chimiotactique sur les monocytes et les basophiles, mais non sur les neutrophiles. Selon différents auteurs, elle induit ou elle n'induit pas d'explosion oxydative dans les monocytes [25].

Un ARNm exprimé par les lymphocytes T et non par les lymphocytes B a été isolé par Schall *et al.* en 1987, et appelé RANTES (*regulated upon activation, normal T expressed and presumably secreted*) (contrôlé par l'activation, exprimé par les T normaux et probablement sécrété). Une activité chimiotactique de la protéine RANTES sur les monocytes et une sous-population des lymphocytes T mémoires a été récemment démontrée [26] (*voir Tableau I*).

Deux ARNm isolés par criblage différentiel

Il existe également deux gènes humains dont l'existence a été démontrée par le criblage différentiel des banques d'ADNc, mais pour lesquels la fonction de la protéine n'a pas été identifiée. IP-10 a un ARNm dont l'augmentation est induite par l'interféron γ dans les monocytes [27]. I-309 a un ARNm exprimé faiblement après l'activation des leucocytes du sang périphérique mais préférentiellement exprimé dans les lignées de lymphocytes T [28].

L'expansion rapide du nombre de membres connus de la famille SIS pendant les trois dernières années a dévoilé une grande famille de gènes dont nous commençons tout juste à apprécier l'importance physiologique.

La structure des protéines SIS et leur activité

Plusieurs de ces protéines SIS existent sous de multiples formes possédant des extrémités amino-terminales différentes. Pour l'IL-8, les cinq acides aminés supplémentaires en position amino-terminale qui différencient les formes II (produites par les cellules endothéliales) et III (produites par les monocytes) (*figure 4a*) réduisent par un facteur deux l'affinité de l'IL-8 pour le récepteur [29]. Dans certains tests d'activité, par exemple l'inhibition de l'adhérence des neutrophiles à l'endo-

thélium activé, la forme la plus courte de l'IL-8 est dix fois plus active [29]. Pour PBP/NAP-2, seule la forme la plus courte (*figure 4a*) a le pouvoir activateur des neutrophiles (NAP-2) [11]. Bien que l'IL-8 existe sous forme dimérique alors que PF4 est un tétramère, les structures des sous-unités de ces deux protéines sont relativement semblables [30, 31]. La structure tridimensionnelle de la protéine IL-8 forme une poche qui ressemble à la structure des antigènes HLA-A2 [30] et qui est composée d'un feuillet β comprenant six brins « anti-parallèles » (*figure 4b*).

Les 15 acides aminés carboxy-terminaux de l'IL-8 forment une hélice α ayant des acides aminés hydrophobes localisés vers l'intérieur et les acides aminés chargés ou polaires, vers l'extérieur (*figure 4b*) [30]. Les autres protéines SIS ont également la possibilité de former cette structure d'hélice α dans leur région carboxy-terminale [30]. Clore *et al.* [30] suggèrent que cette partie carboxy-terminale de l'IL-8 est responsable de la liaison au récepteur. Cette prédiction est en accord avec les activités immunorégulatrices et anti-angiogéniques du fragment carboxy-terminal de PF4 (acides aminés 56-68) [16, 17]. Quoique cette partie carboxy-terminale de PF4 soit également celle responsable de la liaison à l'héparine, l'activité immunorégulatrice ne semble pas être corrélée à l'affinité du PF4 pour l'héparine [17].

Contrairement à la suggestion de Clore *et al.*, un résumé récent de Susuki *et al.* [32] suggère que l'activité chimiotactique de l'IL-8 est contenue dans un peptide minimal de six acides aminés amino-terminaux (leu, pro, arg, ser, ala, lys). Ce résultat laisse perplexe quand on sait que l'IL-8 a été isolée en tant que facteur chimiotactique dérivé des monocytes [1], puisque cet hexapeptide n'est pas présent dans les formes synthétisées par les monocytes (formes III, V, VI, *figure 4a*) [33]. On peut donc supposer que de multiples régions de l'IL-8 sont impliquées dans son activité chimiotactique.

Quelles cellules synthétisent les protéines SIS ?

En dehors des deux protéines plaquettaires (PBP et PF4), les protéi-

nes SIS sont synthétisées par diverses cellules (*Tableau I*). En général, la synthèse de ces protéines est induite en réponse à un *stimulus* (lipopolysaccharide (LPS), esters de phorbol tel le PMA, lectines tel le PHA-P, cytokines tels l'IL-1 et le TNF), mais les différentes cellules ne sont pas toutes stimulées par les mêmes agents. On peut distinguer les cellules qui répondent à un signal « primaire » tel le LPS fourni par les bactéries, signal qui déclenche la réaction inflammatoire. Ces cellules sont principalement les monocytes et les cellules endothéliales. Le LPS stimule également, chez les monocytes, une synthèse importante de l'IL-1 et du TNF. Ces deux cytokines peuvent stimuler — dans une myriade de cellules non immunes (fibroblastes, hépatocytes, chondrocytes...) (*Tableau I*) — la synthèse de l'IL-8 et du MCP-1 qui recrutent les leucocytes vers le site inflammatoire [34].

Nombre de protéines SIS sont synthétisées par les leucocytes mononucléaires du sang périphérique (principalement des monocytes et des lymphocytes T). L'activation des lymphocytes T a des effets variables : elle induit MIP1, mais elle inhibe l'expression de RANTES [28]. L'expression de MCP-1 dans les leucocytes mononucléaires est controversée. Selon différents auteurs, elle serait soit induite, soit réprimée par l'activation de ces cellules [25]. Il semble que, contrairement à l'IL-8, son induction ne peut pas être effectuée par l'IL-1 dans les monocytes [34]. L'expression de MCP-1, comme celle de RANTES, correspond peut-être à un état d'activation intermédiaire des leucocytes, ce qui pourrait servir à limiter le recrutement des monocytes dans un site inflammatoire dû à ces deux facteurs chimiotactiques.

Dans les fibroblastes de souris, l'induction de deux de ces gènes (*KC/gro* et *JE/MCP-1*) par le sérum et les facteurs de croissance, a permis de les considérer comme des membres de la classe *immediate early* (précoce immédiate), c'est-à-dire induite très rapidement et de façon indépendante de la synthèse protéique. Chez l'homme, le gène *gro α* est activé par le sérum, mais non le gène *gro β* , qui lui est homologue à 90 %

RÉFÉRENCES

36. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990 ; 11 : 443-9.

37. Stoeckle MY. Post-transcriptional regulation of $gro\alpha$, β , γ and IL-8 mRNAs by IL-1 β . *Nucleic Acids Res* 1991 ; 19 : 917-20.

38. Poppel K, Vinci JM, Baglioni C. The AU-rich sequences in the 3'-untranslated region mediate the increased turnover of interferon mRNA induced by glucocorticoids. *J Exp Med* 1991 ; 173 : 349-55.

39. Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 1990 ; 144 : 2609-13.

40. Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, et al. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* 1990 ; 171 : 439-48.

41. Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science* 1989 ; 245 : 1490-3.

42. Mantovani A. Tumor-associated macrophages. *Curr Op Immunol* 1990 ; 2 : 689-92.

43. Cushing S, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5134-8.

44. Sharpe RJ, Byers HR, Scott CF, Bauer SI, Maione TE. Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant platelet factor 4. *J Natl Cancer Inst* 1990 ; 82 : 848-53.

45. Brennan FM, Zachariae COC, Chantry D, et al. Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells. *Eur J Immunol* 1990 ; 20 : 2141-4.

46. Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Cerami A. Influence of recombinant murine macrophage inflammatory protein (MIP) 1 β on suppression by MIP1- α of human and murine hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990 ; 76 : 85a.

47. Derynck R, Balentien E, Hee Han J, et al. Recombinant expression, biochemical characterization, and biological activities of the human MGSA/gro protein. *Biochemistry* 1990 ; 29 : 10225-33.

[15]. En revanche, le gène *gro β* est activé par le PMA dans les monocytes mais non le gène *gro α* [15]. Ces diverses protéines ont donc des modes de régulation différents. La plupart des protéines de la classe *immediate early* sont des facteurs de transcription. Le rapport entre l'induction des chimio-attractifs des leucocytes et la prolifération des cellules reste obscur, suggérant peut-être que ces protéines pourraient avoir un autre rôle.

Comment est contrôlée l'expression des protéines SIS ?

La nature transitoire des signaux transmis par les cytokines nécessite que leur production soit hautement contrôlée. Tel est le cas pour les protéines SIS. Dans plusieurs cas, on a démontré que le contrôle de l'expression des gènes SIS par l'IL-1 agit au niveau de la transcription des gènes [35]. Cette régulation est effectuée par la liaison de facteurs nucléaires (NF) sur les séquences d'ADN localisées en amont du site d'initiation de la transcription (figure 5). Les protéines NF- κ B (*m/s n° 1, vol. 7, p. 67*) et NF-IL-6 (*m/s n° 3, vol. 7, p. 288*) ont été impliquées dans la régulation du gène IL-6 par l'IL-1 [36]. Pour le gène IL-8 deux séquences localisées entre -94 et -71 sont nécessaires au contrôle transcriptionnel par l'IL-1 ; elles fixent ces deux protéines NF- κ B et NF-IL-6 (K. Matsushima, 2^e Symposium international sur les cytokines chimiotactiques, Londres, juin 1990). Plusieurs gènes SIS possèdent aussi des sites potentiels de liaison de ces protéines (figure 5). Ces gènes sont tous contrôlés par l'IL-1.

La régulation de l'expression des protéines SIS par l'IL-1 peut aussi être démontrée, à un niveau post-transcriptionnel, par les changements de la stabilité de leurs ARNm [37]. Des séquences riches en AU, et spécifiquement le motif AUUUA, ont été impliquées dans les changements de stabilité des ARNm des cytokines. Il apparaît maintenant que ces séquences AUUUA ne sont pas responsables de l'instabilité intrinsèque des ARNm, mais peuvent jouer un rôle dans les changements de stabi-

lité [38]. La plupart des ARNm des protéines SIS contiennent des séquences AUUUA (figure 5). Le gène *RANTES* dont l'ARNm n'apparaît pas inductible [28] ne contient pas de séquence AUUUA. L'ARNm *Gro β* , qui contient le plus grand nombre de motifs AUUUA, est moins stable que les ARNm de *Gro α* et de *Gro γ* [37]. Il semblerait donc que ces séquences riches en AU puissent être associées à l'inductibilité des ARNm des protéines SIS.

Implications des protéines SIS en pathologie

Plusieurs affections inflammatoires s'accompagnent d'une accumulation de neutrophiles qui est provoquée, au moins en partie, par l'IL-8 : psoriasis, arthrite, asthme, syndrome de détresse respiratoire aiguë, septicémie. Un inhibiteur de l'IL-8 serait donc susceptible d'apporter une amélioration dans ces maladies. Toutefois, dans la mesure où il existe de multiples chimio-attractifs pour les neutrophiles (Tableau I), l'assimilation du NCF (*neutrophil chemotactic factor*, facteur chimiotactique neutrophile) à l'IL-8 n'est pas évidente. Dans certains cas, les anticorps anti-IL-8 ont permis de neutraliser l'activité chimio-attractante, montrant ainsi que cette activité correspondait bien à la présence d'IL-8. Dans d'autres cas, ces anticorps ne sont que partiellement neutralisants [41]. L'importance d'IL-8 par rapport aux autres NCF reste donc à déterminer.

MIP1 a été impliqué dans deux maladies neuro-immunologiques. Chez la souris, elle provoque, avec d'autres cytokines, les changements de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique liés à une méningite à pneumocoques [40]. Elle est également pyrogène [22]. Les inhibiteurs de MIP1 seraient peut-être utiles pour combattre les états fébriles dus à cette protéine qui, contrairement à ceux dus à l'IL-1, ne répondent pas aux traitements par les inhibiteurs de la cyclooxygénase (aspirine, ibuprofène...) [22].

MCP-1 est une cytokine dont nous commençons juste à connaître les multiples rôles. Elle est produite par un grand nombre de lignées cellulaires

de signaux. Dans le liquide synovial de malades atteints d'arthrite rhumatoïde, il n'existe pas de corrélation claire entre le taux de l'IL-8 et l'activité chimiotactique pour les neutrophiles [45], ce qui laisse supposer la présence de molécules agissant en synergie ou en opposition avec l'IL-8 ; une telle situation a été prouvée pour d'autres cytokines comme l'IL-1 et le TNF. Dans le cas de MIP1, une première indication suggère que MIP1 β serait un antagoniste, au niveau du récepteur, de l'inhibition exercée par MIP1 α sur la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse [46]. L'activité hématopoïétique de la moelle pourrait être contrôlée, en partie, par les niveaux relatifs de ces deux protéines (MIP1 α et MIP1 β) qui sont produites par les monocytes et lymphocytes T activés.

La multiplicité des protéines SIS est variable selon les espèces. Pour l'instant, trois gènes *Gro* ont été découverts chez l'homme et seulement deux chez la souris [15]. On ne sait pas si les différentes protéines SIS ont la même activité. La substitution de la proline (Gro α) par la leucine (Gro β , γ) en position 54 des protéines *Gro* (équivalent de la proline 19 dans l'IL-8, *figure 4B*) risque de modifier la structure globale des molécules et donc leurs activités [15]. Diverses variantes de MIP1 α , MIP1 β et PF4, codées par de multiples gènes, existent également chez l'homme. En revanche, l'IL-8 n'a pas été détectée chez la souris. L'organisation groupée des gènes *SIS* pourrait faciliter leur duplication lors des remaniements chromosomiques [5]. Ces duplications sont souvent des événements récents. A travers les différentes espèces, nous constatons donc les aléas du bricolage génétique qu'est l'évolution.

Pour comprendre ce que signifie la redondance apparente de ces protéines, il faudra étudier leurs interactions avec leurs récepteurs. Pour l'instant, ces études sont encore préliminaires. Le récepteur pour l'IL-8 est aussi capable de lier la protéine Gro α , mais avec une affinité cinq fois plus basse [47]. Il sera intéressant de savoir à quel point les interactions entre les récepteurs et les différentes protéines SIS diffèrent du point de

vue quantitatif (différentes affinités pour le même récepteur) plutôt que qualitatif (différents récepteurs). La somme de ces interactions contribue à un réseau de signaux responsable du déclenchement et du maintien d'un état inflammatoire ■

Summary

A new family of inflammatory cytokines

Over the last four years a new family of inflammatory cytokines has been discovered. These cytokines constitute the SIS (small induced secreted) protein family. They show approximately 30 % amino-acid identity, with characteristic conserved cysteine residues. They are synthesised by a variety of leukocyte (monocyte, lymphocyte, platelet) and non-leukocyte (fibroblast, endothelial and other) cell types. The characteristic activity of these cytokines is chemotaxis : principally for neutrophils or monocytes. They are probably the primary agents responsible for the accumulation of neutrophils and monocytes at inflammatory sites. In addition, they have been shown to exert diverse effects (activation, growth, differentiation) on a variety of cell types. In such ways they participate with other cytokines in a complex network of signals responsible for the initiation and control of the inflammatory response.

TIRÉS A PART

A. J. Minty.