

> Cette année encore, dans le cadre du module d'enseignement « Physiopathologie de la signalisation » proposé par l'université Paris-sud, les étudiants du Master « Biologie Santé » de l'université Paris-Saclay se sont confrontés à l'écriture scientifique. Ils ont sélectionné 12 articles scientifiques récents dans le domaine de la signalisation cellulaire présentant des résultats originaux, via des approches expérimentales variées, sur des thèmes allant des interactions hôte-pathogène au métabolisme, en passant par la compétition cellulaire et le microbiote. Après un travail préparatoire réalisé avec l'équipe pédagogique, les étudiants, organisés en binômes/trinômes, ont ensuite rédigé, guidés par des chercheurs, une Nouvelle soulignant les résultats majeurs et l'originalité de l'article étudié. Ils ont beaucoup apprécié cette initiation à l'écriture d'articles scientifiques et, comme vous pourrez le lire, se sont investis dans ce travail avec enthousiasme ! <

## Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales - Masters (9)

L'actualité scientifique vue par les étudiants du Master Biologie Santé, module physiopathologie de la signalisation, Université Paris-Saclay



### Équipe pédagogique

Karim Benihoud (professeur, université Paris-Sud)  
 Sophie Dupré (maître de conférences, université Paris-Sud)  
 Olivier Guittet (maître de conférences, université Paris-Sud)  
 Boris Julien (maître de conférences, université Paris-Sud)  
 Hervé Le Stunff (professeur, université Paris-Sud)  
 Philippe Robin (maître de conférences, université Paris-Sud)  
[karim.benihoud@u-psud.fr](mailto:karim.benihoud@u-psud.fr)

Série coordonnée par Laure Coulombel.

## NOUVELLE

### La perte de SCRIB enflamme les macrophages

Svetlana Sokolova<sup>1</sup>, Camille Lamy<sup>1</sup>, Jérémy Peixoto<sup>1</sup>, Michel Lepoivre<sup>2</sup>

> Les macrophages sont une des unités fonctionnelles de l'immunité innée. Dans les tissus, ils se différencient sous l'influence de stimulus endogènes (cytokines, chimiokines, etc.) ou exogènes (constituants bactériens comme le lipopolysaccharide, LPS) et acquièrent ainsi des phénotypes spécialisés. Les macrophages de phénotype M1 interviennent dans la destruction d'agents microbiens

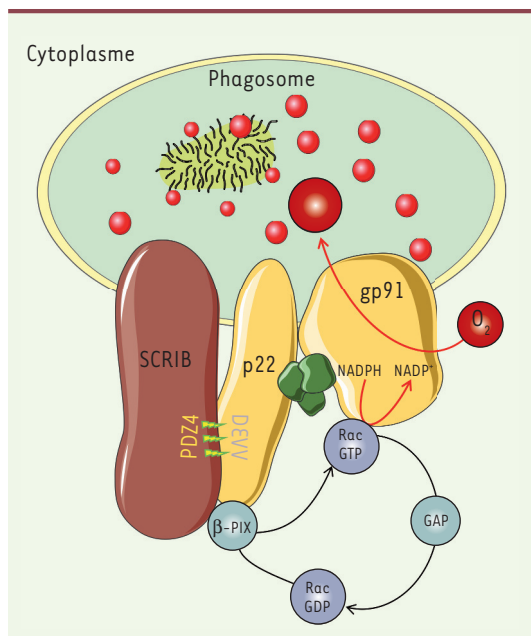
ainsi que dans la production de facteurs pro-inflammatoires (*tumor necrosis factor- $\alpha$*  [TNF- $\alpha$ ], interleukine 1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], IL-12, etc.) [1, 2]. Les macrophages de type M2 sont, eux, impliqués dans la réparation tissulaire, la résolution de l'inflammation par la production de facteurs anti-inflammatoires, et la lutte contre les parasites [1, 2].

L'activité antibactérienne des macrophages M1, ou celle des polynucléaires neutrophiles s'effectue par phagocytose, processus qu'accompagne une production intense de formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase 2

(NOX2), ce qui conduit à la destruction du pathogène. Le complexe NOX2 est formé de plusieurs sous unités (p22<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>) qui s'assemblent à la membrane et interagissent avec la petite protéine G Rac, activée par le GEF (*guanine nucleotide exchange factor*, transformant le GDP en GTP)  $\beta$ -PIX. Des études antérieures dans un tout autre contexte avaient montré que  $\beta$ -PIX pouvait se fixer à une protéine d'échafaudage, Scribble (SCRIB) [3]. SCRIB est localisée à la membrane des cellules et possède quatre domaines d'ancrage protéique de type

Cette Nouvelle fait partie d'une série de 12 Nouvelles rédigées par les étudiants du Master « Biologie Santé » de l'université Paris-Saclay, qui sont parues dans les numéros 6-7 et 8-9 et paraîtront dans les numéros 10 et 11 (2017) de *médecine/sciences*.





**Figure 1.** Schéma représentant l'interaction de SCRIB via son domaine PDZ4 avec les résidus DEVV de p22<sup>phox</sup> du complexe NOX2. L'activation de la petite protéine G Rac est facilitée par la GEF β-PIX interagissant avec SCRIB. Les trois protéines en vert sont p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>. Le complexe actif NOX2 est membranaire et représenté ici à la membrane d'un phagosome contenant la bactérie *Staphylococcus aureus* (schéma réalisé à l'aide des figures Servier Medical Art ; <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/fr/>).

PDZ (*PSD-95, discs-large and ZO-1*) [4, 5]. Elle intervient notamment dans la polarisation des cellules épithéliales, la localisation subcellulaire de complexes multiprotéiques et possède un rôle de suppresseur de tumeur [6]. L'objet des travaux menés par S.K. Muthuswamy *et al.* (Harvard medical school, Boston, Massachusetts, États-Unis) a été de déterminer le rôle de SCRIB dans la production de FRO et l'activité NOX2, en lien avec l'activité antimicrobienne des macrophages [7].

### SCRIB est nécessaire à la production de FRO par les NOX

L'équipe de S.K. Muthuswamy *et al.* s'est intéressée à l'effet d'une diminution de l'expression de SCRIB dans différents types cellulaires [7]. En utilisant des macrophages, des polynucléaires neutrophiles ou des fibroblastes embryonnaires (MEF, *murine embryonic fibroblasts*) provenant de souris exprimant un ARN interférent en épingle à cheveux (*sh, short hairpin*) anti-SCRIB et inducible (*i*) par la doxycycline (SCRIB *ishARN*), les auteurs ont pu mettre en évidence qu'un déficit d'expression de la protéine SCRIB engendrait une diminution de la production de FRO dans ces cellules après stimulation de la NOX2 par du phorbol

12-myristate 13-acétate (PMA) ou un LPS. La production de FRO dans les souris SCRIB *ishARN* est aussi très altérée par l'injection intrapéritonéale de LPS. Cet effet n'est pas restreint aux cellules immunitaires, il a également été observé dans les MEF stimulés par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Ces observations démontrent que SCRIB intervient dans la production de FRO.

### SCRIB interagit physiquement avec p22<sup>phox</sup>

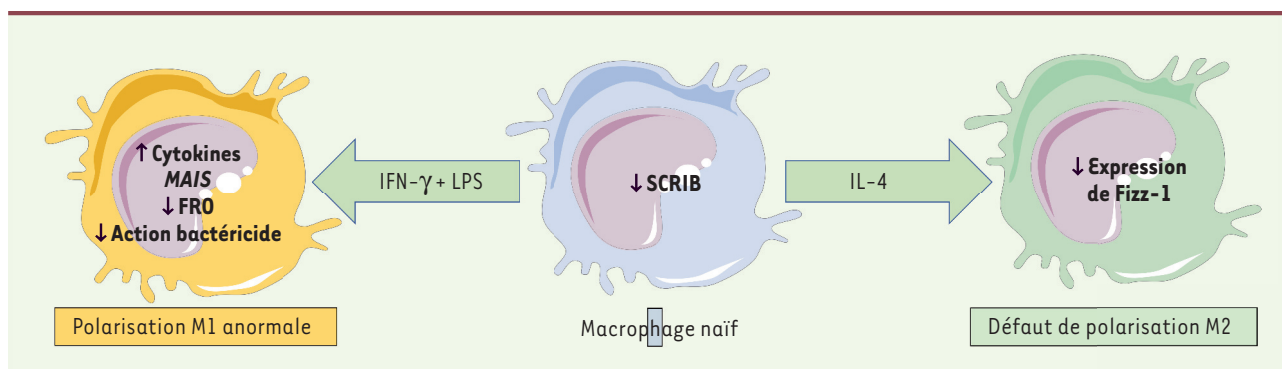
Les auteurs ont montré que l'activation de Rac par le LPS était plus efficace en présence de SCRIB [7]. Des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une association de SCRIB à β-PIX, mais aussi à p22<sup>phox</sup>. L'étude de la séquence primaire de p22<sup>phox</sup> a permis d'identifier une zone d'interaction possible avec le domaine PDZ4 de SCRIB. C'est la région en carboxy-terminal (résidus 192-DEVV-195) de p22<sup>phox</sup> qui interagit plus particulièrement avec les résidus L1111 et G1112 du domaine PDZ4 de SCRIB, comme l'ont déterminé les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'interférométrie en bicouche utilisant les propriétés de réflexion de la lumière. Ce domaine isolé se fixe à p22<sup>phox</sup> avec un Kd de 40 ± 5 μm. Ces expériences ont permis aux auteurs de proposer un modèle structural du domaine PDZ4 de SCRIB fixé à la partie carboxy-terminale de p22<sup>phox</sup>.

### La protéine SCRIB est requise pour l'activité antibactérienne du phagosome des macrophages

La capacité à détruire des bactéries *Staphylococcus aureus* est diminuée d'un facteur quatre chez la souris SCRIB *ishARN* lorsque celle-ci est traitée par la doxycycline afin de réduire l'expression de SCRIB. Dans les expériences réalisées dans des cellules en culture, si SCRIB et p22<sup>phox</sup> sont bien présentes autour des bactéries phagocytées par des macrophages RAW264.7 infectés *in vitro*, l'interaction entre les deux protéines n'est pas nécessaire pour une localisation correcte de SCRIB au niveau de la membrane des phagosomes, comme le montrent des expériences utilisant SCRIB mutée dans le domaine PDZ4 en comparaison de SCRIB sauvage. Cette localisation membranaire nécessite la proline 305 de SCRIB. La perte d'expression de SCRIB n'affecte pas la capacité des macrophages RAW264.7 à phagocyter *S. aureus*, mais elle inhibe la production de FRO dans le phagosome. Ces expériences montrent l'importance de SCRIB pour la genèse de FRO dans le phagosome et pour l'activité antibactérienne qui en résulte, attestant d'un rôle inattendu de SCRIB dans l'immunité innée.

### SCRIB influence la polarisation des macrophages

Par la suite, les auteurs ont étudié l'effet de SCRIB sur la polarisation des macrophages, en suivant l'expression des transcrits de certains marqueurs spécifiques : *Fizz-1* pour le phénotype M2,



**Figure 2. SCRIB est requis pour la polarisation des macrophages.** Schéma représentant la polarisation d'un macrophage naïf exprimant faiblement SCRIB. La polarisation M1 est induite en réponse à une stimulation par l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le lipopolysaccharide (LPS), et celle vers le phénotype M2 par l'interleukine 4 (IL-4) (schéma réalisé à l'aide des figures Servier Medical Art ; <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/fr/>).

*IL-1 $\beta$*  et *IL-12 $\beta$*  pour le phénotype M1. Il apparaît qu'une baisse d'expression de SCRIB diminue la polarisation M2 en réponse à l'IL-4, et exacerbe la polarisation M1 induite par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le LPS. Or, la polarisation M1 joue un rôle prédominant dans l'élimination bactérienne. Il y a donc une contradiction apparente entre le défaut de clairance bactérienne observé dans les macrophages dont l'expression de SCRIB est faible et leur hyperpolarisation M1. Des expériences complémentaires réalisées pour vérifier la fonctionnalité de ces macrophages ont montré que le LPS induisait une forte létalité chez la souris SCRIB ishARN exprimant faiblement SCRIB, alors qu'il n'était pas toxique en présence de cette protéine. Ces souris SCRIB ishARN meurent d'une inflammation pulmonaire excessive résultant d'une infiltration massive de cellules immunitaires, associée à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- $\alpha$ ). Les macrophages M1 de ces animaux sont donc bien fonctionnels. De fortes concentrations de FRO peuvent oxyder et inhiber le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui contrôle l'induction de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Les faibles taux de FRO observés dans des macrophages exprimant faiblement SCRIB et stimulés par le LPS pourraient ainsi favoriser l'activation de NF- $\kappa$ B et donc la production de cytokines pro-inflamma-

toires par les macrophages M1. En accord avec cette hypothèse, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré une fixation accrue de NF- $\kappa$ B sur le promoteur des gènes codant l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans des cellules dépourvues de SCRIB. Cependant, la preuve d'une moindre oxydation de NF- $\kappa$ B dans ces cellules n'a pas été apportée. Ces résultats révèlent de nouvelles fonctions de SCRIB dans la production de FRO, dans l'activité antimicrobienne qui en résulte, ainsi que dans la polarisation des macrophages qui est nécessaire à l'induction et la résolution de l'inflammation. Ils mettent également en évidence un phénotype paradoxal des macrophages puisque la perte de SCRIB induit des macrophages M1 produisant en excès des cytokines inflammatoires, mais incapables à la production de FRO dans des situations d'infection. Cependant, le lien entre ces deux effets n'est pas formellement démontré. Un phénotype similaire a été décrit chez des souris dépourvues de la sous-unité p47<sup>phox</sup> de la NOX2, suggérant là encore une relation causale entre l'inactivation de la NOX2 et une hyperinflammation. Dans leur étude, S.K. Muthuswamy *et al.* démontrent clairement une interaction physique entre SCRIB et la protéine p22<sup>phox</sup> de la NOX2. Cette sous-unité faisant partie d'autres complexes NOX, les auteurs suggèrent une action plus étendue de

SCRIB en rapport avec les multiples fonctions de ces NOX. Une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation cellulaire dépendant de SCRIB-NOX est donc souhaitable. Elle pourrait offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, par exemple dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques et la lutte contre les infections.  $\diamond$

### The loss of SCRIB ignites the macrophages

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008 ; 181 : 3733-9.
2. Mege JL, Capo C. La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 83-8.
3. Audebert S, Navarro C, Nourry C, *et al.* Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Curr Biol* 2004 ; 14 : 987-95.
4. Feigin ME, Akshinthala SD, Araki K, *et al.* Mislocalization of the cell polarity protein scribble promotes mammary tumorigenesis and is associated with basal breast cancer. *Cancer Res* 2014 ; 74 : 3180-94.
5. Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 2000 ; 403 : 676-80.
6. Zeitler J, Hsu CP, Dionne H, *et al.* Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol* 2004 ; 167 : 1137-46.
7. Zheng W, Umitsu M, Jagan I, *et al.* An interaction between Scribble and the NADPH oxidase complex controls M1 macrophage polarization and function. *Nat Cell Biol* 2016 ; 18 : 1244-52.