

> Pour la troisième année, 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 8 articles scientifiques récents dans le domaine de la signalisation cellulaire présentant des résultats originaux, *via* des approches expérimentales variées, sur des thèmes allant des relations hôte-pathogène aux innovations thérapeutiques, en passant par la signalisation hépatique et le métabolisme. Après un travail préparatoire réalisé avec l'équipe pédagogique, les étudiants, organisés en binômes, 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 ! Une de ces Nouvelles est publiée dans ce numéro, les autres le seront dans les prochains numéros de *m/s*. <

Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales - Masters (16)

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

université PARIS-SACLAY	SCHOOL	MASTER
	BIOLOGIE, MÉDECINE, PHARMACIE	Biologie Santé

Équipe pédagogique

Karim Benihoud (professeur, université Paris-Sud)
Sophie Dupré (maître de conférences, université Paris-Sud)
Olivier Guittet (maître de conférences, université Paris-Sud)
Hervé Le Stunff (professeur, université Paris-Sud)
karim.benihoud@u-psud.fr

Série coordonnée par Laure Coulombel.

NOUVELLE

P2X4, Ca²⁺ et CXCL5, un nouveau trio pro-inflammatoire

Ginette Angora¹, Marion Prost¹, Oliver Dellis²

> Les récepteurs purinergiques présents à la surface des leucocytes permettent de détecter des molécules appelées DAMP (*damage-associated molecular pattern*), telles que l'ATP (adénosine triphosphate) extracellulaire qui est libéré lors d'un stress ou d'une mort cellulaire et joue un rôle dans l'inflammation [1]. Deux types de récepteurs purinergiques P2 sont identifiés à la surface des leucocytes : (1) les récepteurs P2X, qui sont des canaux ioniques directement activés par la fixa-

tion d'un ligand (comme l'ATP) et qui permettent l'entrée de cations dont l'ion Ca²⁺ ; (2) les récepteurs P2Y, couplés aux protéines G et qui permettent l'activation de la voie phospholipase C (PLC) - inositol triphosphate (IP₃), aboutissant à la libération des ions Ca²⁺ stockés dans le réticulum endoplasmique (RE) [2].

Alors que le rôle du récepteur P2X7 dans l'activation du macrophage a été très étudié, celui du récepteur P2X4 l'est beaucoup moins. Toutefois, certains tra-

voux semblent montrer que P2X4 intervient dans les activités déclenchées par l'activation de P2X7, comme l'autophagie ou la sécrétion de prostaglandine E2. Dans le contexte inflammatoire, le macrophage assure trois fonctions principales : (1) un rôle de présentation d'antigène, (2) la phagocytose et (3) la production de molécules immunomodulatrices [3]. Parmi les chimiokines pro-inflammatoires, le CXCL5 (*C-X-C motif chemokine 5*), dont la sécrétion par les macrophages

¹M1 Biologie Santé, Université Paris Saclay, 91405 Orsay, France.

²Université Paris Sud UMR-S 1174 Inserm, équipe calcium, bâtiment 440/443, rue des Adèles, 91405 Orsay, France.
ginette.angora@u-psud.fr
marion.prost@u-psud.fr
olivier.dellis@u-psud.fr

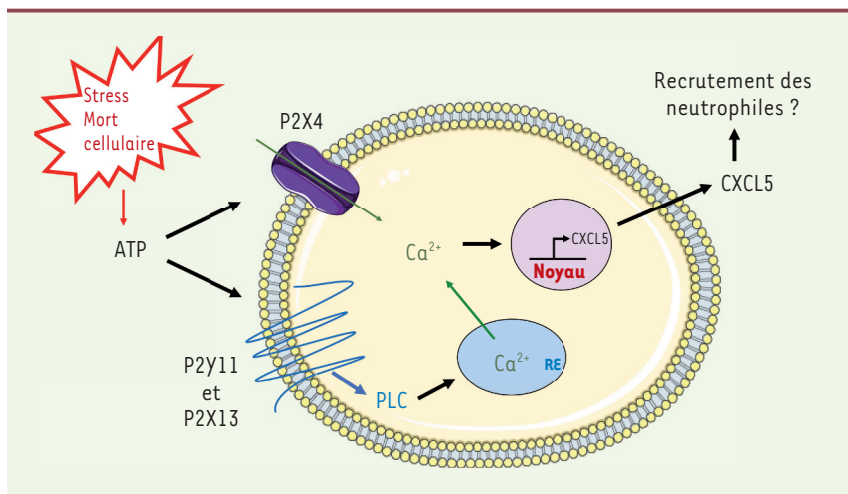


Figure 1. Rôle des récepteurs purinergiques dans la réponse calcique induite par l'ATP extracellulaire et la sécrétion de la chimiokine CXCL5 par les macrophages humains dérivés de monocytes.

L'activation des récepteurs P2Y11 et P2Y13 par l'ATP extracellulaire entraîne la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (RE) via l'activation de la phospholipase C (PLC). La présence du récepteur P2X4 permet aussi à l'ATP d'induire un influx d'ions Ca^{2+} aboutissant à une augmentation directe du calcium intracellulaire. Cette augmentation permet l'expression de l'ARN messager de CXCL5 conduisant à la sécrétion de cette chimiokine pro-inflammatoire. CXCL5 pourrait entraîner la mobilisation des polynucléaires neutrophiles.

humains n'avait pas été montrée jusqu'à maintenant, est capable de mobiliser les neutrophiles. C'est pourquoi, dans un article récent [4], l'équipe de Samuel J. Fountain s'est particulièrement intéressée aux récepteurs P2X et P2Y exprimés par les macrophages humains dérivés de monocytes et à leur potentiel rôle dans la mobilisation calcique induite par l'ATP, aboutissant à la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires telles que CXCL5.

Réponse calcique induite par l'ATP dans les macrophages humains : P2Y11 et P2Y13 sont impliqués dans l'amplitude de la réponse...

En combinant qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) et immunocytochimie, les auteurs ont montré que les macrophages expriment les récepteurs P2X1, P2X4, P2X5, P2X7, mais également P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 et P2Y13. En présence de doses croissantes d'ATP et de Ca^{2+} extracellulaire, la concentration calcique cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) des macrophages augmente de manière biphasique, avec un pic rapide suivi d'une décroissance et

d'un plateau [4]. Les auteurs ont montré qu'en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, le pic d'entrée calcique est toujours présent mais son amplitude est réduite. L'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induite par l'ATP dépend donc à la fois d'un réservoir interne et d'un influx d'ions Ca^{2+} extracellulaires.

Afin de confirmer l'implication d'un réservoir interne, les auteurs ont réalisé le même type d'expérience en prétraitant les macrophages avec un inhibiteur de la PLC (U73122). Ce prétraitement inhibe 90 % des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induites par l'ATP, démontrant l'implication de la voie PLC-IP₃. Pour identifier les récepteurs P2Y impliqués dans cette mobilisation des ions Ca^{2+} , les auteurs ont ensuite répété leurs expériences en présence d'inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs. Seuls les antagonistes des récepteurs P2Y11 (NF340) et P2Y13 (MRS2211) ont été capables de réduire l'intensité du pic de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induite par l'ATP (respectivement d'environ 20 % et 30 %). Combinés, ces deux inhibiteurs réduisent la mobilisation calcique d'environ 50 %. Ces résultats démontrent

que l'ATP active les récepteurs P2Y11 et P2Y13, et que ceux-ci sont responsables de la moitié du Ca^{2+} mobilisé.

... et le récepteur P2X4 dans sa durée

Afin de définir si les récepteurs P2X interviennent dans la mobilisation calcique aux côtés des récepteurs P2Y11 et P2Y13, les auteurs ont prétraité des macrophages humains avec des agonistes et des antagonistes des récepteurs P2X exprimés par ces cellules. Alors que l'inhibition des récepteurs P2X1 (Ro0437626) et P2X7 (A438079) est sans effet sur la mobilisation calcique induite par l'ATP, l'agoniste de P2X4 (l'ivermectine) potentialise d'environ 58 % cette réponse en augmentant et l'amplitude du pic et sa durée. Inversement, les antagonistes du récepteur P2X4 (PSB-12062 et BX430), s'ils ont peu d'effet sur le pic de mobilisation calcique, en réduisent de 40 à 50 % la durée. Cette dichotomie a été confirmée en combinant les antagonistes de P2X4, P2Y11 et P2Y13 : les récepteurs P2Y sont impliqués dans l'amplitude de la réponse calcique, alors que P2X4 intervient dans sa durée.

Seul P2X4 régule l'expression et la sécrétion de la chimiokine CXCL5 par les macrophages

Afin d'identifier les cibles du récepteur P2X4 intervenant dans la durée de la réponse calcique, l'expression de 84 gènes de chimiokines et cytokines a été étudiée après une stimulation par l'ATP seul ou l'ATP en présence d'un inhibiteur du récepteur P2X4 (PSB-12062) ou d'une molécule contrôle (le LPS, lipopolysaccharide). Seule l'expression du gène CXCL5 répond aux critères de sélection : augmentation par l'ATP, aucun effet de PSB-12062 seul et réduction de son expression en présence d'ATP et de PSB-12062. Ainsi, après 24 h d'exposition à l'ATP, l'expression des transcrits CXCL5 est multipliée par 23,5. De même, la protéine CXCL5 sécrétée est mesurable par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dès 24 h, et son taux est maximal à 48 h. L'ajout de PSB-12062 induit une diminution de l'expression des transcrits CXCL5

comme celle de la quantité de protéine sécrétée. Cette inhibition est proportionnelle à la concentration du composé, et elle est maximale (20-25 %) après 48 h. Les mêmes effets s'observent avec l'autre inhibiteur du récepteur P2X4 (BX430) quoique avec une efficacité moindre. Inversement, le prétraitement par l'ivermectine, un modulateur allostérique positif, augmente la sécrétion de CXCL5 de 27 % après 48 h. De plus, en l'absence de calcium extracellulaire, la sécrétion de CXCL5 diminue de 42 % environ et les inhibiteurs du récepteur P2X4 n'ont plus aucun effet. L'ensemble de ces résultats confirme que l'expression du messenger CXCL5, et donc la sécrétion de la protéine correspondante, sont dépendantes de l'entrée des ions Ca²⁺ extracellulaires induite par l'activation du récepteur P2X4. En revanche, les récepteurs P2Y11 et P2Y13 ne sont pas impliqués dans l'expression et la sécrétion de CXCL5, comme le montre l'absence d'effet des inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs sur la sécrétion de CXCL5.

Conclusion

Cette étude a permis de démontrer la présence de plusieurs récepteurs purinergiques P2X et P2Y sur les macro-

phages dérivés de monocytes humains. Ceux-ci ont des rôles spécifiques : la stimulation des récepteurs P2Y11 et P2Y13 par l'ATP extracellulaire contrôle l'amplitude de la réponse calcique via l'activation de la PLC, qui induit la libération du calcium stocké dans le réticulum, alors que celle du récepteur P2X4 contrôle la durée de cette réponse en permettant un influx d'ions Ca²⁺ extracellulaires.

En outre, le récepteur P2X4 serait également le seul à moduler l'expression de l'ARNm de la chemokine CXCL5 et donc sa sécrétion. Or, cette chemokine pourrait être impliquée dans le recrutement des neutrophiles aux sites inflammatoires, fonction qui n'a pas été étudiée par les auteurs de cet article.

Certaines hypothèses peuvent tout de même être émises : ainsi, la connexion entre activation du récepteur P2X4 et sécrétion de CXCL5 pourrait ne pas être directe, et faire intervenir le récepteur P2X7 comme démontré dans les macrophages. En effet, P2X7 intervient dans la sécrétion d'IL-1 β , qui, elle-même stimule la sécrétion de CXCL5 lors d'une inflammation du péritoine [5]. Or, dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris, l'expression

du récepteur P2X4 est nécessaire à la sécrétion d'IL-1 β dépendant de P2X7 [6]. Cela montre que l'interaction entre P2X4 et CXCL5 reste aujourd'hui mal comprise et mérite d'être approfondie dans d'autres études. \diamond

P2X4, Ca²⁺ and CXCL5, a new pro-inflammatory trio

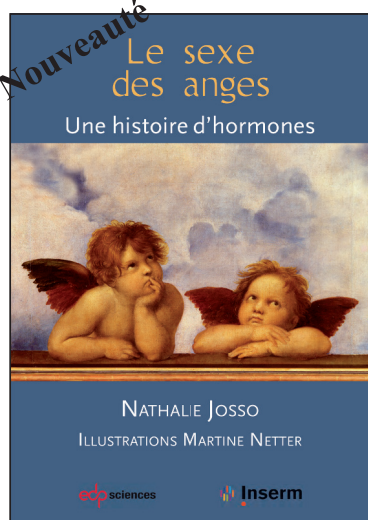
LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2016 ; 16 : 177-92.
2. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2003 ; 2 : 15-28.
3. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 ; 4 : 281-6.
4. Layhadi JA, Turner J, Crossman D, Fountain SJ. ATP evokes Ca²⁺ responses and CXCL5 secretion via P2X₄ receptor activation in human monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 2018 ; 200 : 1159-68.
5. Song J, Wu C, Zhang X, Sorokin LM. In vivo processing of CXCL5 (LIX) by matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 promotes early neutrophil recruitment in IL-1 β -induced peritonitis. *J Immunol* 2013 ; 190 : 401-10.
6. Perez-Flores G, Lévesque SA, Pacheco J, et al. The P2X7/P2X4 interaction shapes the purinergic response in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 467 : 484-90.

Bon de commande à retourner à EDP Sciences, 17, avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex A
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org



NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage

Le sexe des anges : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |