



► Pour la cinquième 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 une quinzaine d'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 ! Trois de ces Nouvelles sont publiées dans ce numéro, les autres le seront dans des prochains numéros. ◀

## Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales - Masters (29)

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

Série coordonnée par Sophie Sibénil.

## NOUVELLE

### Récepteurs purinergiques et fibrose hépatique

Amelle Chouiter<sup>1</sup>, Abdel-Rafik Dali<sup>2</sup>, Olivier Dellis

<sup>1</sup>M1 Biologie-Santé et Magistère de Biologie, Université Paris-Saclay 91405 Orsay, France.

<sup>2</sup>M1 Biologie-Santé, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

<sup>3</sup>Inserm U1174, Univ. Paris Sud, Université Paris Saclay, 91405 Orsay, France.

[amelle.chouiter@u-psud.fr](mailto:amelle.chouiter@u-psud.fr)

[abdel-rafik.dali@u-psud.fr](mailto:abdel-rafik.dali@u-psud.fr)

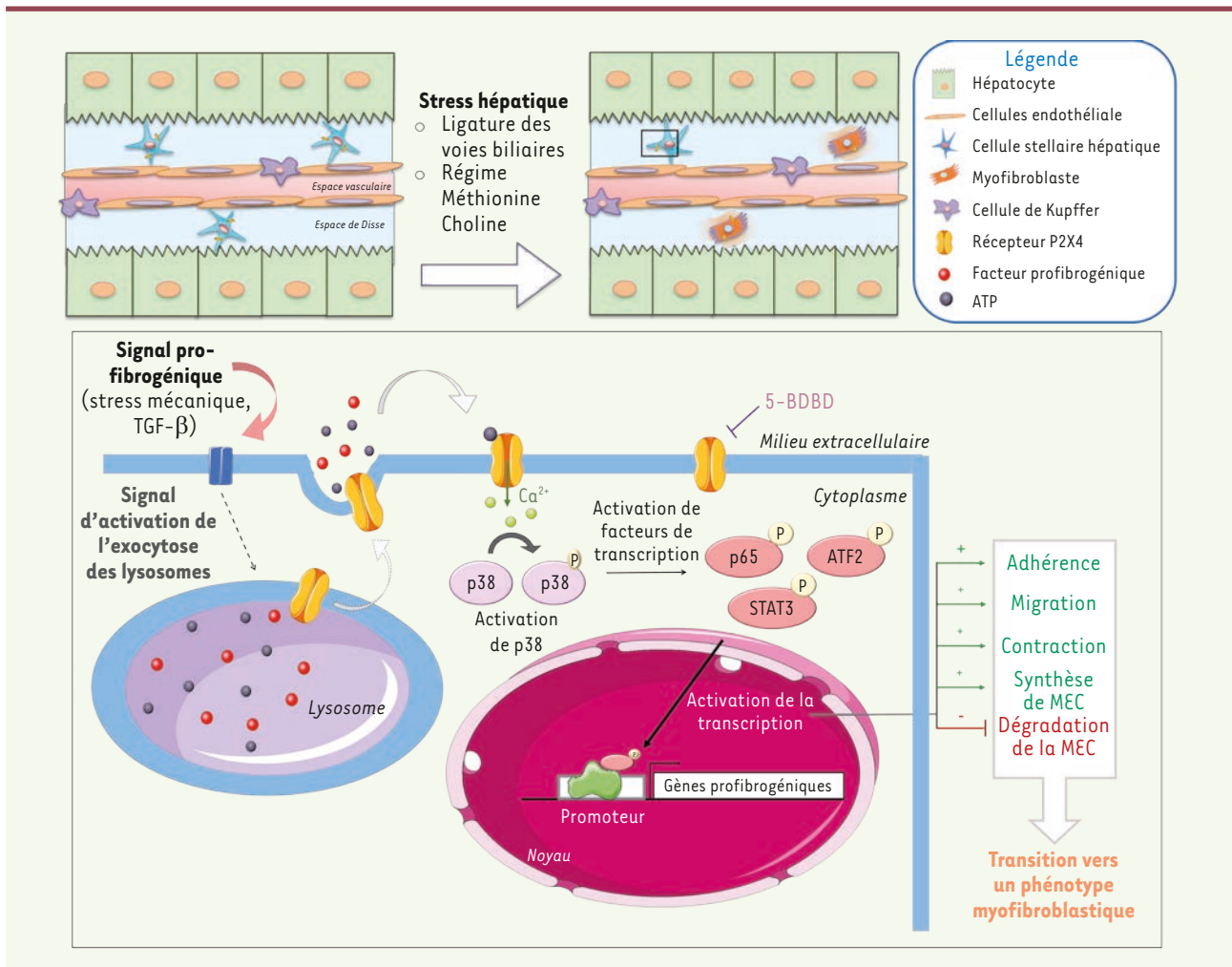
[olivier.dellis@u-psud.fr](mailto:olivier.dellis@u-psud.fr)

► Malgré la très grande capacité de régénération du foie, les fonctions hépatiques sont dégradées durant l'apparition d'une fibrose faisant suite à une lésion chronique. Cette fibrose est caractérisée par une accumulation de matrice extracellulaire (MEC) qui est sécrétée par les myofibroblastes hépatiques [1] issus de la différenciation, induite par la lésion, des cellules étoilées et/ou des fibroblastes hépatiques [2]. Le remodelage de la MEC par les

myofibroblastes repose sur des interactions intercellulaires, mais également sur la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance [3] et de molécules de danger, appelées DAMP (*danger-associated molecular pattern*), comme l'ATP qui est libéré par les cellules en apoptose ou en condition de stress. Deux types de récepteurs de l'ATP coexistent dans le foie, avec des différences d'expression des différentes isoformes selon le type cellulaire. On distingue ainsi les

récepteurs P2X, qui sont des canaux ioniques directement activés par l'ATP (parmi ceux-ci, P2X4 et P2X7 sont les plus exprimés), et les récepteurs P2Y qui sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G [4].

Alors que, à la suite d'une lésion aiguë, la réparation du foie, par des processus dépendant de l'ATP est documentée [4, 5], le rôle des récepteurs P2 dans la fibrogenèse, résultant d'une lésion chronique, a été très peu étudié.



**Figure 1. Voie de signalisation induite par l'activation du récepteur P2X4 impliquée dans la différenciation des cellules stellaires hépatiques et des fibroblastes portaux en myofibroblastes.** En condition de stress, les cellules hépatiques reçoivent différents signaux profibrogéniques (stress mécanique, TGF- $\beta$ ) capables d'activer l'exocytose des lysosomes contenant des facteurs profibrogéniques et de l'ATP. L'ATP libéré est alors capable de se fixer aux récepteurs purinergiques P2X4 exprimés notamment à la surface des cellules stellaires hépatiques et des fibroblastes portaux. L'activation du récepteur entraîne un influx calcique dans ces cellules ainsi que l'activation par phosphorylation de la MAP kinase p38, et des facteurs de transcription ATF2, STAT3 et p65 impliqués dans l'activation de gènes profibrogéniques. Ces modifications de l'expression génique permettent d'augmenter les capacités d'adhérence, de migration, de contraction et de synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) et de diminuer la dégradation de la MEC par ces cellules. L'ensemble de ces propriétés est caractéristique d'une transition vers un phénotype myofibroblastique.

Quelques travaux ont néanmoins montré, par invalidation génique ou pharmacologique, que le récepteur P2X7 était impliqué, selon des mécanismes encore mal compris, dans l'activation et la différenciation des cellules hépatiques stellaires et des fibroblastes portaux en myofibroblastes. Des études ont révélé le rôle de ce récepteur dans la fibrogenèse induite après ligature des voies biliaires [6] ou après traitement au tétrachlorure de carbone (CCl4) [7,8].

Le rôle de P2X4 dans la fibrogenèse hépatique n'avait en revanche pas encore été étudié dans ces modèles de lésions hépatiques. Précédemment, l'équipe dirigée par T. Tordjmann avait mis en évidence une forte expression de P2X4 dans le tissu hépatique, et avait décrit son rôle dans la régulation de la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, de la réorganisation du cytosquelette et de la formation de dépôts de collagène dans des sites extra-hépatiques [9]. Dans un article récent,

cette même équipe s'est donc intéressée au rôle des récepteurs P2X4 dans l'acquisition d'un phénotype profibrogène, en étudiant les fonctions des myofibroblastes [10].

### Le récepteur P2X4 a un effet profibrogénique

Quinze jours après avoir induit une fibrose hépatique, soit par ligature des voies biliaires [11], soit en appliquant un régime alimentaire carencé en



méthionine et choline à des souris [12], les auteurs ont pu montrer que le foie de souris déficientes pour le gène du récepteur P2X4 (souris P2X4-KO) exprimait moins de transcrits de collagène par rapport à celui des souris témoins. Toutefois, l'invalidation de *P2X4* entraînant parallèlement une diminution de l'expression de *P2X7*, les auteurs ont répété les mêmes expériences sur des souris P2X7-KO. Dans ce cas, aucune différence de phénotype n'a été observée chez les souris déficientes pour ce récepteur et présentant des lésions hépatiques. Il apparaît donc que la diminution de l'expression de *P2X7*, observée chez les souris P2X4-KO, n'est pas impliquée dans la diminution de l'apparition du phénotype profibrogénique que l'on note chez les souris P2X4-KO. En utilisant des biopsies de foie de patients, les auteurs ont pu, de plus, montrer une surexpression de P2X4 dans le foie de patients fibrotiques. Ces résultats suggèrent ainsi que l'expression et l'activation de P2X4 jouent un rôle important dans l'apparition de la fibrose hépatique.

### **P2X4 contribue à l'activation des myofibroblastes hépatiques**

Les auteurs se sont ensuite intéressés à l'activité des myofibroblastes hépatiques isolés à partir de souris sauvages ou de souris P2X4-KO. Ils ont alors pu montrer, par une analyse en *western-blot*, que la stimulation de myofibroblastes hépatiques de souris témoins par l'ATP augmente l'expression de l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin), une isoforme de l'actine des muscles lisses. Cette surexpression n'est pas retrouvée dans les myofibroblastes hépatiques des souris P2X4-KO. La protéine  $\alpha$ -SMA étant un marqueur de l'activation des myofibroblastes hépatiques, ce résultat suggère donc un défaut d'activation des cellules P2X4-KO. Pour le confirmer, les auteurs ont testé la contraction de ces cellules, ainsi que leurs capacités d'adhérence à la fibronectine et de migration. Les résultats obtenus montrent que les myofibroblastes hépatiques des souris

P2X4-KO présentent une perte des capacités de contraction et de migration cellulaire et d'adhérence. Une étude semi-quantitative, par une analyse en *western-blot*, détectant différentes protéines de la MEC, a, de plus, mis en évidence un rôle de P2X4 dans le contrôle de l'équilibre entre synthèse et dégradation de protéines matricielles. Ces résultats révèlent donc que P2X4 joue un rôle majeur dans l'activation et les propriétés des myofibroblastes hépatiques.

### **P2X4 permet un influx calcique et l'exocytose de protéines par les myofibroblastes**

Le récepteur P2X4 étant un canal cationique permettant l'entrée des ions  $Ca^{2+}$  dans les cellules, les auteurs ont étudié l'effet du 5-BDBD, un inhibiteur spécifique de P2X4, sur la mobilisation calcique dans les myofibroblastes hépatiques de souris témoins et P2X4-KO. Alors qu'une stimulation par l'ATP induit un influx de  $Ca^{2+}$  dans les myofibroblastes sauvages pouvant être inhibé par le 5-BDBD, la stimulation des myofibroblastes P2X4-KO n'induit que peu d'influx de  $Ca^{2+}$  et le 5-BDBD n'a aucune efficacité sur ces cellules. En raison du défaut de mobilisation du calcium dans les cellules qui n'expriment pas P2X4, l'exocytose de la fibronectine et du TGF- $\beta$ , induite par l'ATP, est inhibée dans les myofibroblastes P2X4-KO. Un dosage de la  $\beta$ -hexosaminidase, une enzyme retrouvée dans le milieu extracellulaire après sécrétion lysosomale, révèle, par ailleurs, une altération de l'exocytose des lysosomes. L'ensemble de ces résultats montre donc que le récepteur P2X4 contrôle les capacités de sécrétion des myofibroblastes.

### **P2X4, une cible thérapeutique dans le traitement des maladies chroniques du foie ?**

Afin de confirmer le rôle de P2X4 dans les fonctions des myofibroblastes hépatiques *in vitro*, l'expression de la protéine  $\alpha$ -SMA et la capacité de contraction ont été étudiées en présence de 5-BDBD.

Alors que cet inhibiteur n'a aucun effet sur les myofibroblastes hépatiques des souris P2X4-KO, le 5-BDBD est capable d'inhiber la surexpression de l' $\alpha$ -SMA et la contraction induite par l'ATP dans les cellules exprimant le récepteur. *In vivo*, le traitement de souris témoins par le 5-BDBD, durant 7 à 15 jours, après ligature des voies biliaires, réduit fortement la surexpression de l' $\alpha$ -SMA ainsi que l'accumulation de collagène dans le foie, confirmant que l'inhibition de P2X4 permet de réduire l'activation des myofibroblastes hépatiques et de protéger le foie de la fibrose.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'implication de la voie de signalisation déclenchée par l'activation du récepteur P2X4 dans le processus de fibrogenèse hépatique induit de manière chronique. P2X4 activé, via la sécrétion d'ATP par les lysosomes, permet l'entrée de calcium et, en conséquence, l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse de facteurs profibrogéniques, comme la fibronectine (Figure 1). L'inhibition de P2X4 atténue le profil profibrogénique des myofibroblastes hépatiques durant l'induction de la fibrose. L'utilisation d'un antagoniste de P2X4 permet donc de contrôler la balance fibrogénique/fibrolytique. Le récepteur P2X4 constituerait ainsi une cible thérapeutique intéressante pour lutter contre les maladies chroniques du foie.  $\diamond$

### **Purinergic receptors and hepatic fibrosis**

#### **LIENS D'INTÉRÊT**

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

#### **RÉFÉRENCES**

1. Lu D, Insel PA. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *Am J Physiol-Cell Physiol* 2014 ; 306 : C779-88.
2. Karin D, Koyama Y, Brenner D, et al. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation* 2016 ; 92 : 84-92.
3. Hicks DF, Goossens N, Blas-García A, et al. Transcriptome-based repurposing of apigenin as a potential anti-fibrotic agent targeting hepatic stellate cells. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 42563.

## RÉFÉRENCES

- Gonzales E, Julien B, Serrière-Lanneau V, et al. ATP release after partial hepatectomy regulates liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2010 ; 52 : 54-62.
- Besnard A, Gautherot J, Julien B, et al. The P2X4 purinergic receptor impacts liver regeneration after partial hepatectomy in mice through the regulation of biliary homeostasis. *Hepatology* 2016 ; 64 : 941-53.
- Wu X, Wang Y, Wang S, et al. Purinergic P2X7 receptor mediates acetaldehyde-induced hepatic stellate cells activation via PKC-dependent GSK3 $\beta$  pathway. *Int Immunopharmacol* 2017 ; 43 : 164-71.
- Huang Y, Liu W, Xiao H, et al. Matricellular protein periostin contributes to hepatic inflammation and fibrosis. *Am J Pathol* 2015 ; 185 : 786-97.
- Tung HC, Lee FY, Wang SS, et al. The beneficial effects of P2X7 antagonism in rats with bile duct ligation-induced cirrhosis. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0124654.
- Garcin I, Tordjmann T. Calcium signalling and liver regeneration. *Int J Hepatol* 2012 ; 2012 : 1-6.
- Le Guilcher C, Garcin I, Dellis O, et al. The P2X4 purinergic receptor regulates hepatic myofibroblast activation during liver fibrogenesis. *J Hepatol* 2018 ; 69 : 644-53.
- Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, et al. Bile duct ligation in Mmice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp* 2015 ; 52438.
- Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008 ; 49 : 1068-76.

## NOUVELLE

### Le lipidosome

#### Lieu de synthèse de LTB<sub>4</sub>, un médiateur de l'inflammation stérile

Camille Dupouy<sup>1</sup>, Laura Saban<sup>1</sup>, Sophie Dupré-Crochet<sup>2</sup>

### Cristaux de silice et inflammation pulmonaire

L'exposition répétée aux cristaux de silice est responsable de la silicose, qui est une des maladies professionnelles les plus répandues dans le monde. Elle se caractérise par une fibrose progressive du poumon et est associée au risque de développer d'autres maladies, dont le cancer du poumon [1]. L'inhalation de cristaux de silice entraîne un recrutement de polynucléaires neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes dans les poumons, à l'origine d'une inflammation stérile<sup>1</sup>. Des médiateurs de l'inflammation, tels que le leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) et l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), contribuent au recrutement de ces cellules immunitaires [2,3]. Les mécanismes cellulaires responsables de la production de ces médiateurs, notamment de LTB<sub>4</sub>, en présence de cristaux de silice sont encore peu connus. Les cristaux de silice, présents dans les poumons, sont internalisés dans les cellules épithéliales, les

mastocytes et les macrophages résidents. Dans ces derniers, Hornung et al. ont observé une rupture des phagolysosomes contenant les cristaux de silice, avec pour conséquence une activation de l'inflammasome NLRP3<sup>2</sup> (→) et de la caspase 1. Cela permet le clivage de la pro-IL1 $\beta$  synthétisée<sup>3</sup> en IL-1 $\beta$  [2]. LTB<sub>4</sub> est produit dans les cellules à partir de l'acide arachidonique grâce à la 5-lipoxygénase (5-LO) et la leucotriène A<sub>4</sub>-hydrolase (LTA<sub>4</sub>H). Dans un article récent [5], Hegde et al. ont identifié les processus cellulaires conduisant à la synthèse de LTB<sub>4</sub> en présence de cristaux de silice. L'originalité de l'étude réside aussi dans l'identi-

(→) Voir la Synthèse de Y. Jamilloux et T. Henry, m/s n° 11, novembre 2013, page 975

<sup>1</sup> M1 Biologie Santé, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

<sup>2</sup> Institut de Chimie Physique, UMR8000, CNRS, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

[camille.dupouy@u-psud.fr](mailto:camille.dupouy@u-psud.fr)

[laura.saban@u-psud.fr](mailto:laura.saban@u-psud.fr)

[sophie.dupre@u-psud.fr](mailto:sophie.dupre@u-psud.fr)

fication du lieu de synthèse de cette molécule.

### À la recherche des mécanismes cellulaires et moléculaires de production du LTB<sub>4</sub> et de l'IL-1 $\beta$

Les auteurs ont tout d'abord étudié le rôle de la phagocytose de cristaux de silice sur la production de LTB<sub>4</sub> dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules, préalablement stimulées avec du lipopolysaccharide (LPS), ont été traitées avec de la cytochalasine D (Cyt D), qui inhibe la polymérisation de l'actine. Des expériences de microscopie confocale montrent que des macrophages incubés avec la Cyt D perdent leur capacité à phagocyter des cristaux de silice. De même, la Cyt D inhibe la production de LTB<sub>4</sub> et d'IL-1 $\beta$  par les macrophages murins stimulés avec des cristaux de silice. La production de LTB<sub>4</sub>, en présence de Cyt D et de cristaux de silice, est également inhibée dans les polynucléaires neutrophiles et les mastocytes ; ceux-ci ne produisant pas d'IL-1 $\beta$ . La phagocytose des cristaux est donc néces-

<sup>2</sup> L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique constitué d'un récepteur NLRP3, d'un adaptateur ASC et de la caspase 1. L'activation du récepteur par les protéases lysosomales (cathepsines) entraîne l'oligomérisation du complexe et le clivage de la pro-caspase 1 en caspase 1 [4].

<sup>3</sup> Dans les articles [2] et [5], les macrophages sont pré-activés avec du lipopolysaccharide (LPS), ce qui active le récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4). La voie de signalisation du TLR4 induit l'activation de la voie des MAPK et la synthèse de la pro-IL-1 $\beta$  via NF- $\kappa$ B [6].

<sup>1</sup> Inflammation induite par la libération de signaux de danger provenant du soi, et non par une infection.