Identification des voies biochimiques stimulées par le récepteur purinergique P2X7 qui sont impliquées dans le clivage protéolytique du précurseur de la protéine amyloïde (APP)

Amel Rayah

▶ **To cite this version:**

Amel Rayah. Identification des voies biochimiques stimulées par le récepteur purinergique P2X7 qui sont impliquées dans le clivage protéolytique du précurseur de la protéine amyloïde (APP). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. ⟨NNT : 2015PA11T043⟩. ⟨tel-02927761⟩

HAL Id: tel-02927761

https://theses.hal.science/tel-02927761v1

Submitted on 2 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :
BIOSIGNE

Laboratoire :
Laboratoire Activation Cellulaire et Transduction des Signaux,
CNRS, UMR 8619, Université Paris 11, Orsay

THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Amel RAYAH

Identification des voies biochimiques stimulées par le récepteur purinergique P2X7 qui sont impliquées dans le clivage protéolytique du précurseur de la protéine amyloïde (APP).

Date de soutenance : 25/09/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Jean KANELLOPOULOS	Professeur Université Paris 11
Co-directeur de thèse :	Pierre BOBE	Professeur Université Paris 11
Président du Jury :	Karim BENIHOUD	Professeur Université Paris 11
Rapporteurs :	Sahil ADRIOUCH	Maître de Conférence/ Rouen
	Nadine VARIN-BLANK	DR/ Université Paris 13
Examinateurs :	Cécile DELARASSE	CR1/ ICM La Salpêtrière
	Jean-Luc PERFETTINI	DR/ IGR

UNIVERSITE PARIS-SACLAY
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Ecole doctorale : Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Amel RAYAH

Le 25 Septembre 2015

Identification des voies biochimiques stimulées par le récepteur purinergique P2X7 qui sont impliquées dans le clivage protéolytique du précurseur de la protéine amyloïde (APP).

Directeur de thèse : **Pr Jean KANELLOPOULOS**

Co-Directeur de thèse : **Pr Pierre BOBE**

JURY

Pr Karim BENIHOUD	Président
Dr Sahil ADRIOUCH	Rapporteur
Dr Nadine VARIN-BLANK	Rapporteur
Dr Cécile DELARASSE	Examinateur
Dr Jean-Luc PERFETTINI	Examinateur
Pr Jean KANELLOPOULOS	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Il est temps d'écrire mes remerciements. La thèse a été une aventure scientifique et humaine très enrichissante. Il ne faut jamais cesser d'apprendre. Pour que la science avance, il est essentiel de discuter.

Alors voilà, je profite de ce moment, pour vous qui êtes passé une fois dans ma vie et qui m'avez apporté quelques choses. Merci à vous.

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Karim Benihoud de me faire l'honneur de présider ma thèse. Merci, pour tes encouragements, ta présence et ta bonne humeur. J'ai énormément apprécié d'encadrer les TP!!
Merci au Dr Sahil Adriouch et au Dr Nadine Varin-Blank d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail malgré les emplois du temps surchargés. Je remercie également le Dr Cécile Delarasse et le Dr Jean-Luc Perfettini d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Je remercie très vivement le Pr Jean Kanellopoulos qui m'a beaucoup apporté durant cette thèse. Merci d'avoir conduit ce projet de thèse, merci pour la disponibilité et la patience sans faille dont vous avez fait preuve.
Cher Jean, j'espère que tu trouveras dans ces quelques mots toute ma gratitude et ma reconnaissance, pour le Scientifique mais également pour la Personne que tu es.
Merci pour la transmission de ton savoir, de la passion et du « think positive ». Je ferai en sorte de ne pas l'oublier. J'ai tant appris pendant ces années.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Michel Lepoivre. Merci pour tout! Je n'ai pas les mots… Mais, je retiendrai toujours que le vélo est beau et qu'il doit sortir prendre l'air.

Je remercie Pierre Bobé, mon co-directeur de thèse. Pour sa présence, sa disponibilité et sa bonne humeur. Merci pour les échanges durant les réunions bibliographiques.

Amaria, je te remercie pour ce que tu m'as apporté et m'apporte encore. Ta patience, ta gentillesse, ton courage et ta franchise font que tu es quelqu'un d'exceptionnel.

A Rodolphe, pour la présence et ton savoir !!!! Promis je te ferai la bise après ma soutenance.

Je tiens à remercier chaque membre de l'Institut pour les aides, leurs bonnes humeurs, leurs gentillesses, les attentions et les marques de sympathie qui m'ont tant touché. Merci.

A toi ma petite Anne. Je pense qu'on aurait dû t'appeler patience. Merci pour les rires, et les discussions scientifiques ou non, autour d'un verre. Merci pour ces moments. Ne doute plus jamais de toi !!!

Merci à Aimeric, à Olivier et à Hélène pour votre bonne bonne humeur et votre soutien !!!!

Pour l'équipe du SAR car pour moi vous restez le SAR (Steph, Jojo Sandrine). Merci Mamarie (alias Maman Marie)!!! Merci pour tout.

Un grand Merci aux neuro, à Hervé pour les bons conseils depuis mon master, à Heather (quel bonheur de t'avoir croisée!!! Et à ma douce Micka…

Un merci à la team !!! Steeve, j'espère qu'il y aura encore beaucoup de soirées (de nuits) à bavarder et à refaire le monde autour d'un thé.
A toi Pilou pour ton amitié. Le rire de Zaza ne me quittera jamais!!!
A Romain, pour ton pragmatisme et ta bonne humeur. Courage bonhomme, la fin est proche.
Je remercie très vivement Simon Bossi ô grand maître, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour… (Ces mots ont été écrits sous la contrainte !!!)
A Amina, Alex, Thomas, Quentin, ma Lulu…. pour les soirées, les rires, les joies et les dossiers qui n'ont rien à faire là.

Aux chimistes. A toi, Gilles, Yann, Alex, Dom, Louis Ta Gueule. Merci à vous.
A ceux qui sont passés par l'institut et qui sont repartis… Ma petite Cathy, non je ne t'oublie pas. Et, il faut que tu saches… Ils ont changé la photocopieuse☺, à Pierre Christian Violet (PCV) pour la disponibilité, les rires!!! A cause de toi, j'ai développé une réaction allergique sévère. Mon corps ne tolère plus Mickey et Obélix.

Merci à Cagri alias tchou tchou pour ces bons moments et cette belle rencontre. La médaille Fields n'est pas loin, j'ai confiance.

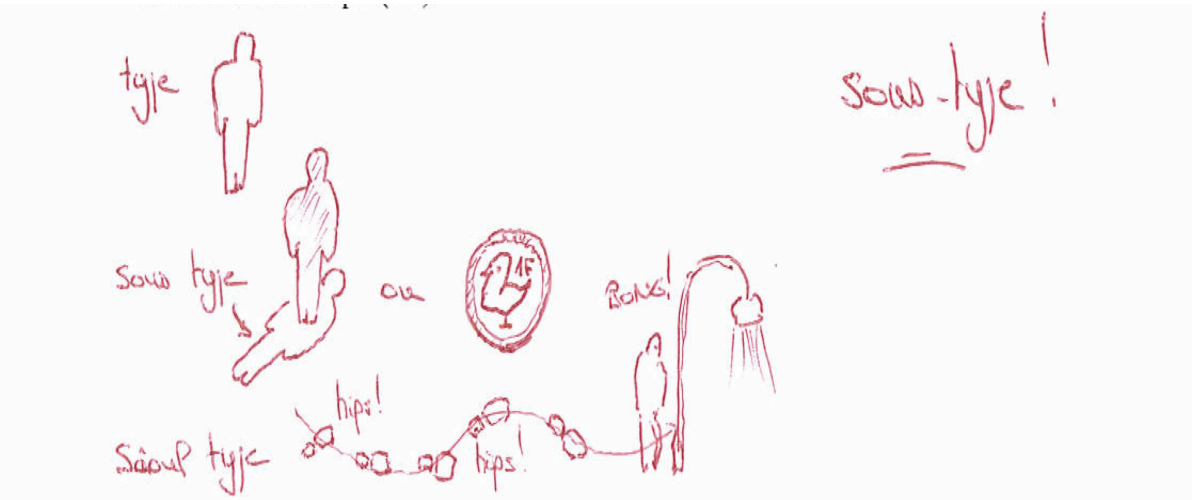
A toi Kahina, je pense avoir déjà tout dit lors du petit discours à ton mariage. Alors, tu sais déjà tout le bonheur que je te souhaite et à quel point tu comptes.

Ces derniers mots iront à ma famille.
Merci à mes parents.
A Sam, Mimil et Fad, le plus beau reste à construire.
Parce que vous êtes mes pépites de bonheur, à vous (par ordre d'apparition) : Yanis, Ilian, Célia, Adem, Alya et Nohé. Puissent vos avenirs être radieux et vos cœurs toujours remplis de rire.

« Impose ta chance, serre ton bonheur et va vers ton risque.
A te regarder, ils s'habitueront. »
René Char

« We will never give up. »
Churchill

Parce qu'il y a des corrections qui ne vous feront plus jamais oublier les traits d'union…



Anonyme (alias MLP)

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS **12**

LISTE DES FIGURES **14**

LISTE DES TABLEAUX **16**

INTRODUCTION **17**

1. LES RECEPTEURS PURINERGIQUES **18**

1.1 LES RECEPTEURS P2Y **19**

1.2 LES RECEPTEURS P2X **21**

1.2.1 SYNTHESE ET TRAFIC DES RECEPTEURS P2X 24

1.2.2 MOBILITE DES RECEPTEURS 24

1.2.3 MULTIMERISATION 24

1.2.4 PHARMACOLOGIE DES RECEPTEURS P2X 26

1.2.5 DISTRIBUTION ET FONCTIONS DES P2X 28

1.3 LE RECEPTEUR P2X7 **30**

1.3.1 GENE ET ISOFORMES 30

1.3.2 EXPRESSION 32

1.3.3 MOBILITE 32

1.3.4 PROPRIETES ET PHARMACOLOGIE 33

1.3.4.1 Les agonistes du récepteur P2X7 34

1.3.4.2 Les antagonistes du récepteur P2X7 34

1.3.4.3 Les modulateurs allostériques du récepteur P2X7 34

1.3.5 STRUCTURE PROTEIQUE : DOMAINES ET MUTATIONS 35

1.3.6 FONCTIONS DU RECEPTEUR P2X7 38

1.3.6.1 Formation du pore non sélectif 38

1.3.6.2 P2X7 et bourgeonnement vésiculaire (blebbing) 40

1.3.6.3 P2X7 dans la mort cellulaire 41

1.3.6.4 P2X7 et inflammation 41

1.3.6.4.1 Inflammasome NLRP3 et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires 42

1.3.6.4.1.1 Activation séquentielle de l'inflammasome 42

1.3.6.4.1.2 Modèles d'activation de NLRP3 : 43

1.3.6.5 P2X7 et la coupure des molécules de surface 47

1.3.7 ROLE DU P2X7R DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX DE PATHOLOGIES 48
1.3.7.1 Rôle du P2X7R dans les maladies du SNC 48
1.3.7.1.1 Rôle du P2X7R dans la douleur inflammatoire chronique ou neuropathique 48
1.3.7.1.2 Rôle du P2X7R dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer 48
1.3.7.2 Rôle du P2X7R dans les maladies auto-immunes 49

2. LA SUPERFAMILLE 4.1 55

2.1 EZRINE, RADIXINE ET MOESINE (ERM) 55
2.1.1 STRUCTURE DES ERM 55
2.1.2 REGULATION DE L'ACTIVATION DES ERM 57
2.1.2.1 Interaction intra et intermoléculaires 57
2.1.2.2 Activation des ERM 57
2.1.2.2.1 Activation des ERM par les phosphoinositides 58
2.1.2.2.2 Activation des ERM par phosphorylation 59
2.1.2.3 Inactivation des ERM 59
2.1.3 FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ERM 61
2.1.3.1 Phénotypes des souris invalidées pour les gènes codant les ERM 63
2.1.3.2 Rôle dans la coupure protéolytique de molécules de surface 64
2.1.3.3 Rôle dans le trafic des récepteurs de surface 64
2.1.3.4 Rôle des ERM dans l'adhésion, la migration et la survie cellulaire 65
2.1.3.5 Rôle dans la synapse immunologique 66
2.2 LA MERLINE : 67
2.2.1 GENE, EXPRESSION ET STRUCTURE DE LA MERLINE 67
2.2.2 MECANISMES D'ACTIVATION ET D'INACTIVATION DE LA MERLINE 67
2.2.3 FONCTIONS DE LA MERLINE 67

3. LES METALLOPROTEASES 69

3.1 LES METALLOPROTEASES MATRICIELLES (MMP) 69
3.2 LES METALLOPROTEASES MATRICIELLES TRANSMEMBRANAIRES (MT-MMP) : 69
3.3 LES METALLOPROTEASES ADAMS: 70
3.3.1 LES METALLOPROTEASES ADAMS 10 ET 17: 71
3.3.1.1 REGULATION DE L'ACTIVITE DES ADAMS 10 ET 17 71
3.3.1.1.1 Activation par les pro-protéines convertases : 71
3.3.1.1.2 Activation par les ROS : 72
3.3.1.1.3 Activation par phosphorylation : 72
3.3.1.1.4 Rôle des tétraspanines dans l'activation d'ADAM10: 73

3.3.1.1.5 Rôle des iRhoms dans l'activation d'ADAM17: 73
3.3.1.1.6 Inactivation des ADAMs 10 et 17: 74
3.3.1.1.7 Compensation entre ADAMs 10 et 17: 74
3.3.1.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ADAMS 10 ET 17 74
3.3.1.2.1 FONCTIONS BIOLOGIQUES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC) 75
3.3.1.2.1.1 Implication dans la neuroprotection : 75
3.3.1.2.1.1.1 Coupure de l'APP 75
3.3.1.2.1.2 Implication dans la croissance et le guidage neuronale : 75
3.3.1.2.1.2.1 Coupure de Notch 75
3.3.1.2.1.2.2 Coupure de L1CAM : 76
3.3.1.2.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES DANS L'INFLAMMATION : 76
3.3.1.2.2.1 Le TNFα et son récepteur 76
3.3.1.2.2.2 Récepteur à l'interleukine 6 : 76

4. LE PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE (APP) 77

4 .1 LA MALADIE D'ALZHEIMER 77
4.1.1 ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES 77
4.1.2 HISTORIQUE DE LA MALADIE 78
4.1.3 SYMPTOMES CLINIQUES ET DIAGNOSTIC DE LA MA 78
4.1.4 DIFFERENTES FORMES DE LA MA : 80
4.1.4.1 Forme sporadique de la MA 80
4.1.4.1.1 Le gène ApoE4 80
4.1.4.1.2 Autres loci de susceptibilité 80
4.1.4.2 Forme héréditaire (ou familiale) de la MA 81
4.1.5 CARACTERISTIQUES NEUROPATHOLOGIQUES DE LA MA 81
4.1.5.1 Altération macroscopique 81
4.1.5.2 Altération microscopique : lésions histologiques liées à la maladie 82
4.1.5.2.1 Les plaques séniles. 82
4.1.5.2.2 Les dégénérescences neurofibrillaires 83
4.1.5.2.3 Inflammation dans la MA 84
4.1.6 HYPOTHESE DE LA CASCADE AMYLOÏDE 84
4.2 METABOLISME DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE 87
4.2.1 STRUCTURE, ISOFORMES ET EXPRESSION DE L'APP 87
4.2.2 MATURATION ET ADRESSAGE DE L'APP 88
4.2.3 FONCTIONS DE L'APP 89
4.3 CATABOLISME DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE 89

4.3.1 VOIE AMYLOÏDOGENIQUE ET VOIE NON AMYLOÏDOGENIQUE 89
4.3.1.1 Description de la voie amyloïdogénique 90
4.3.1.2 Récepteurs impliqués dans la voie amyloïdogénique 90
4.3.1.3 Description de la voie non amyloïdogénique 91
4.3.1.4 Récepteurs impliqués dans la voie non amyloïdogénique 92
4.3.1.4.1 Récepteurs de type RCPG 92
4.3.1.4.2 Récepteurs purinergiques 92
4.3.1.4.2.1 Le récepteur P2Y2 92
4.3.1.4.2.2 Le récepteur P2X7 93
4.3.2 LES SECRETASES DANS LA COUPURE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE 94
4.3.2.1 Sécrétase-α 94
4.3.2.2 Sécrétase -β 95
4.3.2.3 Sécrétase-γ 95
4.3.2.4 Sécrétase-ε 96
4.3.3 PRODUITS ISSUS DU CATABOLISME DE L'APP 97
4.3.3.1 Les Peptides amyloïdes 97
4.3.3.1.1 Origine des peptides aβ 97
4.3.3.1.2 Les différents peptides amyloïdes 97
4.3.3.2 Domaine intracellulaire de l'APP (AICD) 98
4.3.3.3 Propriétés des fragments solubles APPα et APPβ 99
4.3.3.3.1 Fragment soluble APPβ 99
4.3.3.3.2 Fragment soluble APPα 99

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS 101

RESULTATS 103

IMPLICATION DE L'EZRINE LA RADIXINE ET LA MOESINE DANS LA COUPURE PROTEOLYTIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOIDE APRES ACTIVATION DU RECEPTEUR P2X7.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 117

1.IMPLICATION DES ERM DANS LA COUPURE PROTEOLYTIQUE DE L'APP DEPENDANTE DE LA STIMULATION DU P2X7R. 118
1.1 Etude de la voie biochimique 118
1.2 Une nouvelle métalloprotéase à l'origine de la coupure de l'APP par P2X7. 121
1.3 Interaction P2X7R/Ezrine 123

1.3.1 Site de fixation P2X7R/Ezrine 123
1.4 La liaison des ERM au P2X7R est-elle indispensable à la coupure protéolytique de l'APP ? 127
1.5 Les ERM sont-elles indispensables à la coupure protéolytique de toutes les molécules de surface? 134
1.6 Dualisme du récepteur P2X7 : neuroprotection *vs* neuroinflammation 140
1.7 Conséquences de l'activation du P2X7R dans la coupure protéolytique 143

BIBLIOGRAPHIE 146

ANNEXE 181

Résumé

Le précurseur de la protéine amyloïde (APP) est une protéine transmembranaire qui, après coupure séquentielle par les sécrétases β et γ, produit des peptides Aβ trouvés dans les plaques séniles de patients atteints d'Alzheimer. Par contre, la forme soluble de l'APP (sAPPα), produite après coupure par une sécrétase α, augmente la survie cellulaire, la croissance des neurites et la synaptogénèse. L'APP est coupée au site α par 3 métalloprotéases : ADAM9, ADAM10 et ADAM17.
Notre laboratoire a montré que la stimulation du récepteur purinergique P2X7 (P2X7R) provoque la coupure protéolytique du précurseur de la protéine amyloïde (APP). Le Dr Delarasse a établi que la voie non amyloïdogénique est mise en jeu et que c'est le fragment sAPPα, neuroprotecteur, qui est produit. De plus, le laboratoire a précédemment démontré que ce ne sont pas les alpha-sécrétases ADAM9, 10 et 17 qui sont responsables du clivage protéolytique de l'APP après stimulation du P2X7R dans les cellules de neuroblastome Neuro2a.
Durant mes travaux de thèse, nous avons étudié la voie biochimique menant à la libération du fragment sAPPα. L'activation du P2X7R stimule la phosphorylation et la translocation rapide à la membrane plasmique de protéines, appelées ezrine, radixine et moesine (ERM) qui ont la capacité d'établir un lien entre la région cytosolique du P2X7R et la F-actine. Les ERM jouent un rôle crucial dans la coupure protéolytique de l'APP par les métalloprotéases ADAM. En effet, l'inhibition de l'expression des ERM par RNA interférence aboutit à une absence de coupure de l'APP. Par ailleurs, nous avons observé que les $MAPK^{ERK1/2\ et\ JNK}$ et la ROCKinase sont nécessaires à la phosphorylation activatrice des ERM et jouent donc un rôle en amont des ERM. Enfin, nous avons mis en évidence le rôle de la PI3K en aval des ERM. Par ailleurs, nous avons démontré que l'activation du récepteur purinergique P2X7 entraînait la coupure protéolytique de la molécule NrCAM par ADAM17 aboutissant à la libération du fragment soluble de l'ectodomaine de NrCAM. Les résultats obtenus indiquent que la coupure de NrCAM est dépendante de l'activation et de la fixation des ERM à NrCAM. Ces résultats suggèrent fortement que les ERM sont indispensables à la coupure protéolytique de différents substrats après stimulation du P2X7R.
Les données obtenues mettent en évidence un mécanisme moléculaire original et important qui fait jouer aux ERM un rôle central de « liens moléculaires » dans le clivage protéolytique des protéines transmembranaires. A ce stade de notre étude, nous émettons l'hypothèse que les ERM agissent en aval du récepteur P2X7, en liant les substrats et/ou les protéases qu'ils regroupent à la membrane plasmique favorisant ainsi le clivage des substrats.

Abstract

The amyloid protein precursor (APP) can be cleaved in neural cells by α-secretases to produce the soluble APP ectodomain (sAPPα), which is neuroprotective. We have shown previously that activation of the purinergic receptor P2X7 (P2X7R), a member of the P2X receptor family of ATP-gated cation channels, triggers sAPPα shedding from neural cells. Here, we demonstrate that the activation of Ezrin/Radixin/Moesin proteins (ERM) is required for the P2X7R-dependent proteolytic processing of APP leading to sAPPα release. Indeed, the down regulation of ERM by siRNA blocks the P2X7R-dependent shedding of sAPPα. We also show that P2X7R stimulation triggers the phosphorylation of ERM. Thus, ezrin translocates to the plasma membrane to interact with P2X7R. Using specific pharmacological inhibitors, we have established the order in which several enzymes trigger the P2X7R-dependent release of sAPPα. Thus, a Rho-kinase and the MAPK modules ERK1/2 and JNK act upstream of ERM while a PI3Kinase activity is triggered downstream. This work for the first time identifies ERM as major partners in the regulated non-amyloidogenic processing of APP. In addition, we have recently established that the stimulation of P2X7R leads to the proteolytic cleavage of NrCAM by ADAM17 and the shedding of the soluble extracellular domain of NrCAM. Our results clearly show that the proteolytic cleavage of NrCAM is dependant of ERM activation and fixation to the intracellular region of NrCAM. Thus, our results strongly suggest that ERM are required for the proteolytic cleavage of numerous substrates after P2X7R stimulation. Our findings suggest that ERM play a central role in the proteolytic cleavage of transmembrane proteins and act as molecular links which aggregate ADAMs and substrates at the plasma membrane promoting the cleavage of substrates.

LISTE DES ABREVIATIONS

2-AG : Arachidonoylglycérol

β2A : β-2Adrénergique

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinases

AG : Appareil de Golgi

AICD : APP Intracellular Domain

APP : Amyloid Precursor Protein

ART : ADP- Ribosyltransferase

ATP : Adénosine-5'-Triphosphate

Aβ : Amyloid β

BACE : Beta site APP Cleaving Enzyme

BBG : Brillant Bleu G

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

Bz-ATP : 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP

CARD : Caspase Recruitement Domain

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CTD : C-terminal domain

DAMP : Damage Associated Molecular Patterns

DAPI : 4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DHHC : Motif des PAT comprenant les acides aminés D (Asp) H $(His)_2$ C (Cys)

DOR : Récepteurs aux opioïdes

DRM : Detergent Resistant Membrane

EAE : Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale

EGF : Epidermal Growth Factor

ERK : Extracellular signal regulated Kinase

ERM : Ezrine Radixine-Moesine

ERMAD : ERM Association Domain

FERM : Four.1 protein Ezrin Radixin Moesin

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert

GSK : GlaxoSmithKline

HEK : Human Embryonic Kidney

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HSP : Heat Shock Protein

IP3 : Inositol 1, 4, 5-triphosphate

JNK : c-jun N terminal Kinase

KN-62 : 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine

KO : Knock-Out

LBP : LPS Binding Protein

Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LOK : Lymphocyte-orientated kinase

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Leucin Rich Repeat

MA : Maladie d'Alzheimer

MAGuK : Membrane-associated guanylate kinases

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

MMP : Matrix Metalloproteinases

MNMII : Myosine Non Musculaire II
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NKT : Natural Killer T
NMDG : N-Methyl D Glucamine
NO : Nitric Oxyde
NPC : cellules neurales progénitrices
o-ATP : 2' 3' Dialdéhyde-ATP
PALM : Microscopie par localisation photo-activée
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PAR : Polyarthrite rhumatoïde
PAT : Protein Acyl Transferase
PGE2 : Prostaglandine E2
PI : Propidium iodide
PI4K : Phosphatidylinositol 4-kinase
PI4P5K : Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phospholipase C
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PS : Phosphatidylsérine
PTB : phospho-tyrosine binding
PTPH1 : Protein tyrosin phosphatase H1
PYD : Pyrin Domain
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
RE : Réticulum Endoplasmique
ROCK : Rho-Associated, coiled-coil containing protein Kinase
ROS : Reactive Oxygen Species
RPTPβ : Receptor protein Tyrosine phosphatase- β
SABD : Spectrin Actin Binding Domain
SH2 : Src Homology 2
SLE : Lupus érythémateux disséminé
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Single nucleotide polymorphism
TLR : Toll Like Receptor
TM : Transmembranaire
TNF : Tumor Necrosis Factor
UDP : Uridine-5' Diphosphate
UTP : Uridine-5' Triphosphate
WT : Wild Type
YO-PRO-1 : 4-((3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene)methyl)-1-(3-(trimethylammonio)propyl)quinolinium diiodide

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Origines de l'ATP extracellulaire
Figure 2 : Classification des récepteurs purinergiques
Figure 3 : Structure schématique des récepteurs P2X
Figure 4 : Structure cristallographique du récepteur P2X4 du poisson zèbre
Figure 5 : Désensibilisation des récepteurs P2X
Figure 6 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs P2X
Figure 7 : Isoformes du P2X7R identifiés chez l'Homme et la souris
Figure 8 : Visualisation du pore non sélectif du P2X7R par incorporation de bromure d'éthidium après application d'ATP
Figure 9 : Principaux agonistes et antagonistes du récepteur P2X7
Figure 10 : Protéine interagissant avec le P2X7R
Figure 11 : La stimulation du P2X7R par l'ATP induit un phénomène de blebbing
Figure 12: Mécanisme de production de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18
Figure 13 : Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3
Figure 14 : Organisation de l'ezrine, la radixine et la moesine
Figure 15 : Mécanisme d'activation/inactivation des ERM
Figure 16 : Voies de signalisation et fonctions cellulaires impliquant les ERM
Figure 17 : Représentation schématique des domaines constituant les métalloprotéases
Figure 18 : Mécanisme d'activation des ADAM
Figure 19 : Atrophie hippocampique dans la MA
Figure 20 : Aspect des plaques séniles dans la MA à l'examen microscopique
Figure 21 : Aspect des DNF dans la MA à l'examen microscopique
Figure 22 : Hypothèse de la cascade amyloïde
Figure 23: Isoformes de l'APP issues d'un épissage alternatif
Figure 24 : Coupure du précurseur de la protéine amyloïde (APP) par les sécrétases
Figure 25 : La stimulation du récepteur P2X7 par le Bz ATP aboutit à la libération du fragment soluble sAPPα
Figure 26 : Sites de coupures de l'APP par les sécrétases (α, β, γ et ε)
Figure 27 : Etapes de formation des plaques amyloïdes dans la MA
Figure 28 : Représentation schématique de la voie biochimique impliquée dans la coupure de l'APP suite à l'activation du P2X7R.

Figure 29 : Représentation schématique de la voie biochimique aboutissant à la libération du fragment sAPPα, suite à la stimulation du récepteur PAC1 par son ligand PACAP.
Figure 30 : Régions cytoplasmiques du P2X7R murin
Figure 31 : Résumé des hypothèses concernant le rôle des ERM dans la rapprochement des molécules de surface responsable de la coupure protéolytique.
Figure 32 : Séquences des régions intracytoplasmique et points isoélectriques des protéines APP, ADAM10 et ADAM 17.
Figure 33 : Exemple d'une liaison en cis entre l'APP endogène et l'APP muté (à gauche) ou d'une liaison avec une autre protéine capable de lier les ERM.
Figure 34 : Représentation schématique de la molécule d'adhérence NrCAM.
Figure 35 : Représentation schématique des mutants de la molécule NrCAM obtenus par le Dr Faivre Saraillh.
Figure 36 : Représentation des voies biochimiques induites par les récepteurs NMDA, TrkB et P2X7 responsables de l'inhibition par phosphorylation de GSK3. Ces voies promeuvent la survie des cellules granulaires du cervelet.
Figure 37 : Mécanismes de la transactivation des EGFR suite à une coupure de son ligand par une ADAM.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Association des sous-types des récepteurs P2X pour former des homo ou des hétérotrimères.

Tableau 2: Caractérisation de SNP du gène codant le récepteur P2X7.

Tableau 3: Kinases impliquées dans l'activation des ERM

Tableau 4: Molécules interagissant avec les ERM :

Tableau 5 : Prévalence (%) de la maladie d'Alzheimer et syndromes apparentés en fonction de l'âge et du sexe en France.

Tableau 6 : Fonctions du fragment soluble APPα

Tableau 7 : Point isoélectrique de la région cytoplasmique des différentes protéines de surface

Tableau 8 : Résultats préliminaires obtenus sur NrCAM endogène, les mutants cités ci-dessus et sur la molécule L-selectine constituant le contrôle positif.

INTRODUCTION

1. LES RECEPTEURS PURINERGIQUES

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) a été découverte en 1929 simultanément par deux groupes (Lohman à Heidelberg et Fiske et SubbaRow à Harvard). Longtemps, les scientifiques ont attribué à l'ATP le rôle unique de substrat énergétique indispensable au métabolisme cellulaire. Désormais, il est admis que les nucléotides et les nucléosides sont des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire en agissant sur différents types de récepteurs. La libération dans le milieu extracellulaire de l'ATP et de ses dérivés générés par l'action d'ectonucléotidases participent à de nombreux processus physiologiques.

La concentration d'ATP est comprise entre 3 et 10 mM au niveau intracellulaire tandis que sa concentration extracellulaire est de l'ordre du nanomolaire. Différents mécanismes sont à l'origine d'une augmentation extracellulaire en ATP. Au niveau neuronal, des vésicules sécrétoires, riches en ATP et en neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, la noradrénaline ou le peptide intestinal vasoactif (VIP), peuvent être libérées (1).

L'accroissement de la quantité extracellulaire d'ATP peut également avoir pour origine la lyse cellulaire au niveau de foyers inflammatoires. Plus récemment, il a été suggéré que les connexines seraient responsables du transport de l'ATP (2 , 3). De nombreuses études ont rapporté le rôle de la pannexine dans la libération extracellulaire d'ATP (4 , 5). Cependant, des macrophages déficients en pannexine libèrent de l'ATP dans le milieu extracellulaire *via* un récepteur purinergique, mettant en lumière un autre mécanisme de libération de l'ATP (6).

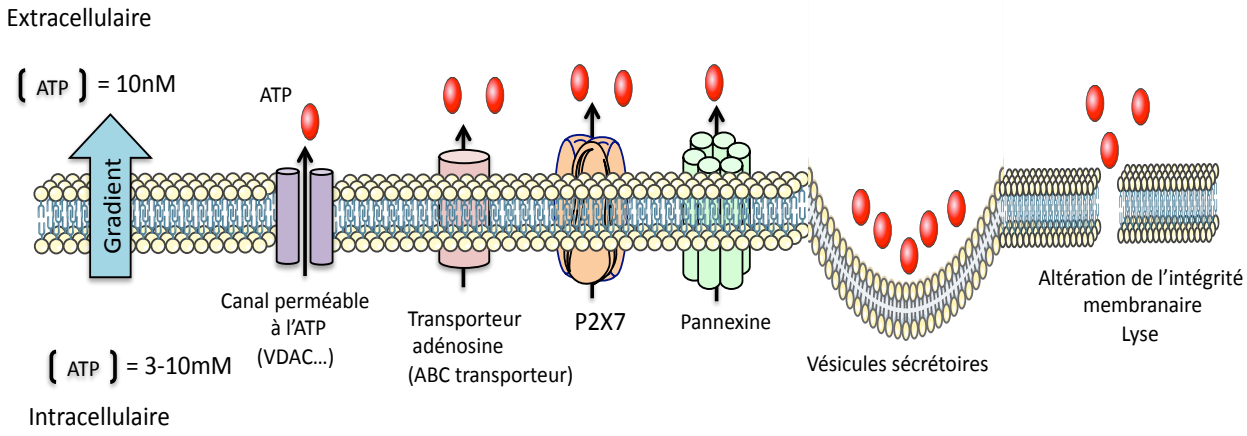


Figure 1 : Origines de l'ATP extracellulaire.

Les récepteurs purinergiques constituent une famille de récepteurs membranaires ayant pour ligand l'ATP ou ses dérivés. En 1972, Burnstock propose le concept de neurotransmission purinergique attribuant à l'ATP le rôle de neurotransmetteur. En 1994, Abbracchio et Burnstock établissent une classification des récepteurs purinergiques en deux groupes : les récepteurs P1 activés par l'adénosine et les récepteurs P2 activés par l'ATP ou ses dérivés (Figure 2) (7). Les récepteurs P2 sont subdivisés en deux sous-groupes :

- les récepteurs métabotropiques P2Y, possédant 7 passages transmembranaires et couplés aux protéines G
- Les récepteurs ionotropiques P2X (P2XR) qui sont des canaux ioniques activés principalement par l'ATP.

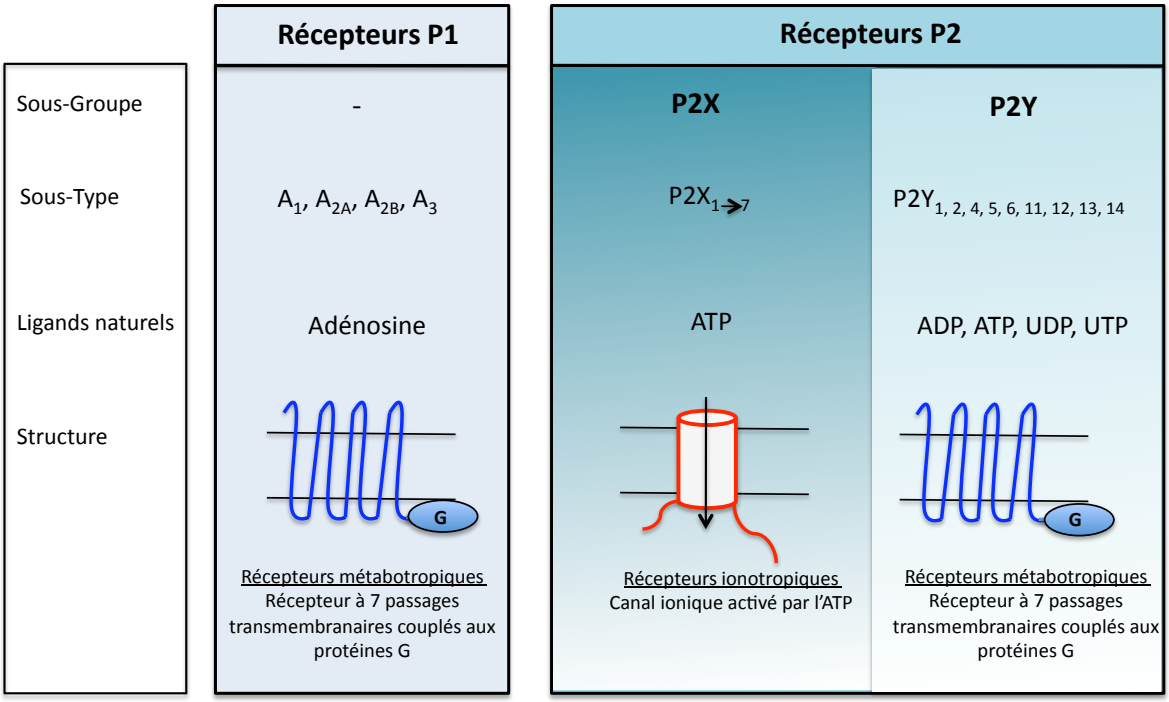


Figure 2: Classification des récepteurs purinergiques

1.1 LES RECEPTEURS P2Y

Le premier récepteur P2Y a été cloné en 1993. Chez l'Homme, on dénombre huit récepteurs P2Y : $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11\rightarrow 14}$. Ces récepteurs sont des protéines à sept segments transmembranaires associés à des protéines G hétérotrimériques. Ils sont activés par des purines (ATP/ADP) et/ou par des pyrimidines (UTP/UDP). Ils peuvent être séparés en deux sous-groupes :

- Un premier groupe couplé à la protéine Gq/11 ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$) qui active la phospholipase C responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4, 5- diphosphate et de la production de diacylglycérol et d'inositol trisphosphate (IP3). L'IP3 se fixe sur un récepteur du réticulum endoplasmique et provoque une libération de calcium dans le cytosol à partir des stocks calciques du réticulum endoplasmique (RE).
- Les récepteurs couplés aux protéines Gi/o ($P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) qui inhibent l'activité adénylate cyclase et donc la production d'AMPc (8).

Le récepteur P2Y11 présente la particularité de pouvoir lier les protéines Gq/11 et Gi/o.

Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et participent à de multiples processus physiopathologiques. Dans les cellules d'origine hématopoïétique, les récepteurs P2Y1 et P2Y12 sont responsables de l'activation et de l'agrégation plaquettaire par l'ADP. En effet, l'activation de P2Y1 mobilise les stocks de calcium intracellulaire, induit un changement morphologique des plaquettes et amorce l'agrégation plaquettaire tandis que P2Y12 va amplifier le phénomène d'agrégation et le rendre irréversible (9). De nombreux antagonistes des récepteurs P2Y12 sont commercialisés ou en phase d'essai comme thrombolytiques : les thiénopyridines tels que clopidogrel (Plavix®), prasugrel (Efient®), ticlopidine (Ticlid®), cangrelor (AR-C69931MX), ticagrelor (AZD6140) et elinogrel (PRT060128) (10). L'activation du récepteur P2Y6 joue un rôle important dans l'expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) favorisant le recrutement de cellules immunitaires dans le poumon et l'intestin (11 , 12). Dans le système nerveux central, les récepteurs P2Y sont présents sur les cellules gliales ainsi qu'au niveau des membranes pré- et post-synaptiques suggérant leurs rôles dans le processus inflammatoire et la neurotransmission. Ces récepteurs modulent la libération de neurotransmetteurs en agissant sur des canaux calciques dépendants du voltage (13).

Le récepteur P2Y2 possède un rôle ambivalent. En effet, sa stimulation conduit à la production de médiateurs inflammatoires parmi lesquels des dérivés de l'acide arachidonique *via* l'action de la phospholipase A2. Cependant, on lui attribue également une fonction neuroprotectrice car son activation aboutit à la coupure du précurseur de la protéine amyloïde (APP) par une sécrétase α, permettant la libération du fragment neurotrophique sAPPα (14).

1.2 LES RECEPTEURS P2X

Les récepteurs P2X (P2XR) sont des récepteurs ionotropiques. Ces récepteurs sont principalement activés par l'ATP extracellulaire et forment des canaux ioniques perméables aux cations (Ca^{++}, Na^{+}). Ils sont constitués par l'assemblage de trois sous-unités distinctes associées de façon non covalente. Les premiers récepteurs P2X ont été clonés en 1994 (15 , 16). A l'heure actuelle, les sept membres de la famille P2XR (P2X1-7) ont été identifiés.

Les P2XR sont des protéines de 379 (P2X6) à 595 (P2X7) acides aminés qui présentent entre elles des homologies de séquences allant de 26 à 50%. La partie C-terminale est la moins conservée avec une longueur variable (de 27 à 239 acides aminés). Le monomère P2X7 se distingue des autres P2XR par sa longue partie C-terminale engagée dans la transduction de signaux (17 , 18).

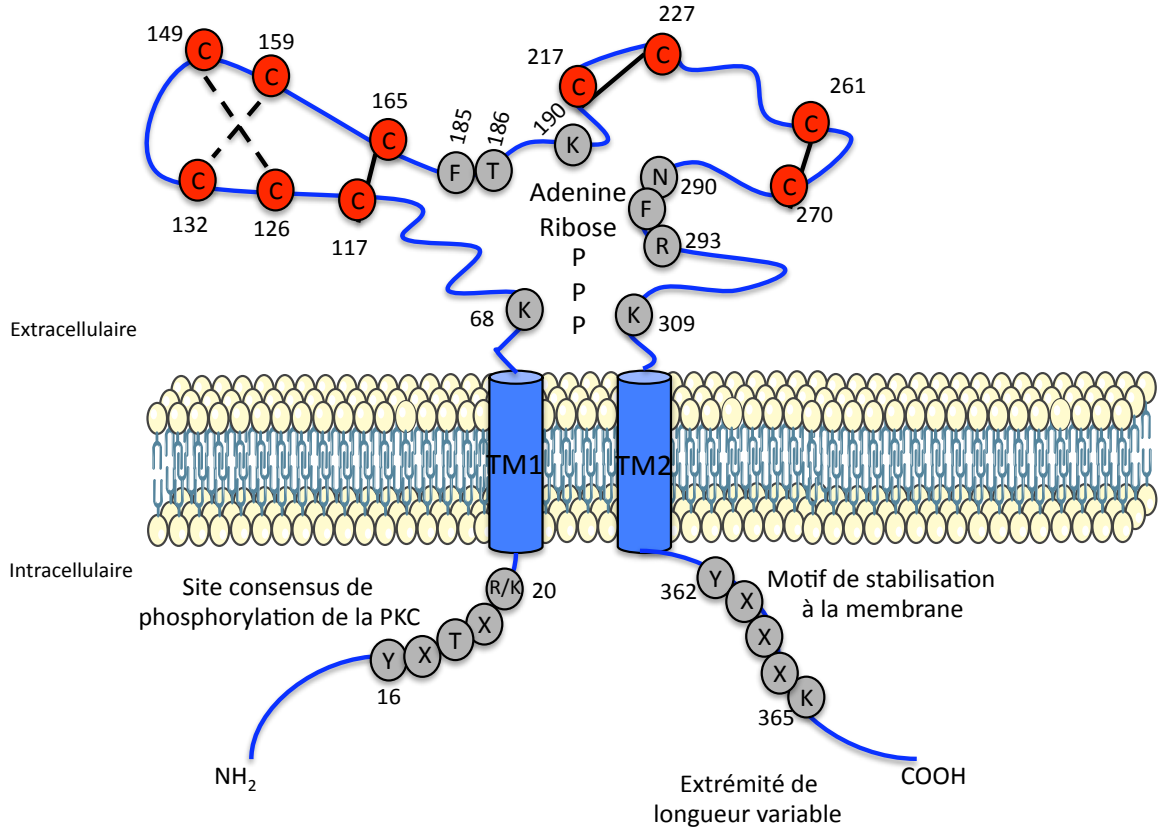
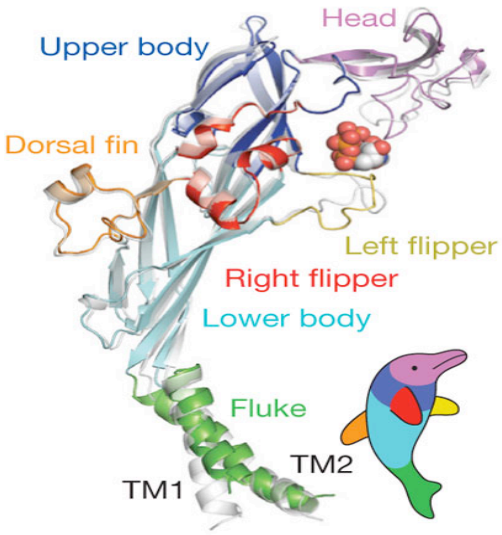


Figure 3 : Structure schématique des récepteurs P2X

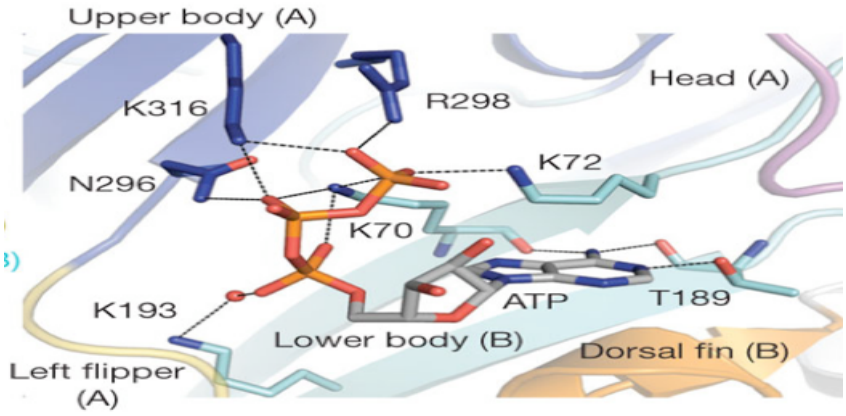
Les segments transmembranaires (TM1 et TM2) sont représentés en bleu. Dans la boucle extracellulaire, les cystéines impliquées dans des ponts disulfures sont indiquées par des ronds rouges et les résidus responsables de la liaison de l'ATP sont représentés par des ronds gris. Dans la région intracellulaire, les acides aminés impliqués dans la liaison aux PKC ainsi qu'un motif de stabilisation du récepteur à la membrane sont illustrés par des ronds gris.

La structure tertiaire de chaque sous-unité de P2XR est constituée de deux segments transmembranaires, une longue boucle extracellulaire hydrophile contenant le site de fixation à l'ATP et des régions N- et C-terminales situées au niveau intracellulaire. Le domaine extracellulaire contient dix résidus cystéines conservés formant des ponts disulfures et assurant la rigidité de la structure ainsi que différents sites de N-glycosylation (de deux à six sites). Les extrémités N- et C-terminales cytosoliques contiennent respectivement la séquence consensus de phosphorylation de la PKC ainsi qu'un motif YxxxK de stabilisation à la membrane plasmique (Figure 3). Récemment, la résolution de la structure cristallographique du récepteur P2X4 tronqué de ses parties intracellulaires a permis de mieux préciser la structure des P2XR (19). En effet, les auteurs ont déterminé l'architecture du P2X4 à l'état fermé et à l'état ouvert et ont comparé la structure obtenue à un dauphin afin de faciliter la compréhension (Figure 4a et 4c). Leurs résultats ont permis de confirmer une architecture trimérique de ces récepteurs. Les trois monomères s'organisent en une structure dite caliciforme. La partie centrale de la boucle est structurée par deux feuillets β riches en ponts disulfures assurant la rigidité de la structure. De plus, ces données ont permis d'identifier les sites de liaisons de l'ATP et de suggérer un mécanisme aboutissant à l'ouverture du canal. L'obtention du cristal de P2X4 en présence de son ligand a permis de localiser le site de fixation de l'ATP à l'interface de deux monomères. Ceux-ci participent à la formation d'une poche riche en résidus chargés positivement favorisant la fixation de l'ATP^{4-}. Plus précisément, la fixation de l'ATP met en jeu des acides aminés provenant de deux sous-unités que nous appellerons monomère A et B. La Lys70 du monomère B occupe une position cruciale en interagissant avec l'oxygène des groupements phosphates α, β et γ de l'ATP. L'Asn 296 et la Lys 316 du monomère A lient le phosphate β tandis que la Lys 72 du monomère B et l'Arg 298 et la Lys 316 du monomère A interagissent avec le phosphate γ de l'ATP (Figure 4b). D'autre part, les auteurs ont montré que la fermeture du canal s'explique par le croisement des segments transmembranaires 2 de chaque sous-unité. La fixation du ligand entraîne des changements conformationnels s'illustrant par le rapprochement de la « tête » et de la « nageoire dorsale » renforçant la liaison de l'ATP et la rotation du corps central sur lui même. Cette rotation aura pour conséquence l'écartement des segments transmembranaires et l'ouverture du canal (Figure 4b). Dans le vestibule central, la forte représentation en résidus acides assure la sélectivité aux cations. Enfin, la structure ayant été obtenue en absence des parties intracellulaires du récepteur, aucune donnée n'a pu être apportée quant à la formation du pore non sélectif.

a)



b)



c)

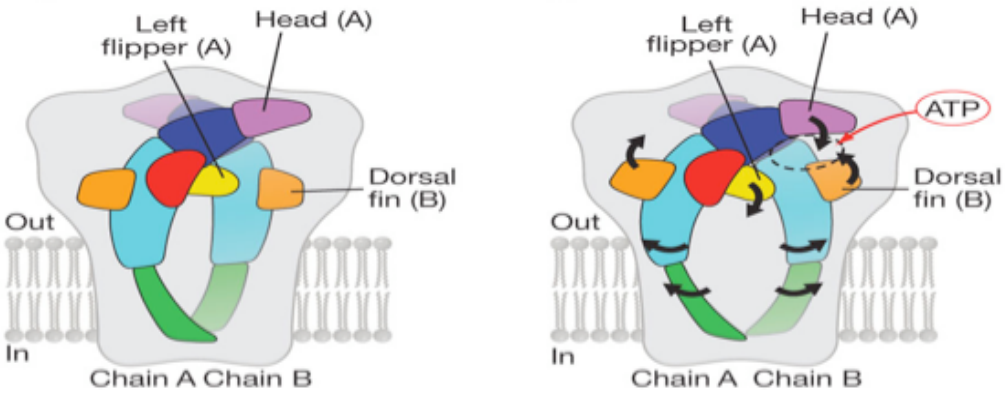


Figure 4 : Structure cristallographique du récepteur P2X4 du poisson zèbre (19). **a)** Structure tertiaire d'une sous-unité du P2X4 du poisson zèbre. Les auteurs ont observé que chaque monomère du récepteur s'apparente à un « dauphin ». Ainsi, les deux segments transmembranaires constitués par des hélices α représentent la queue du dauphin. La boucle extracellulaire, représentant le corps du dauphin est composée de deux feuillets β riches en ponts disulfures. Cette boucle est également constituée de régions flexibles représentant la tête et les nageoires. La fixation de l'ATP est ainsi dépendante de la nageoire dorsale de la sous-unité voisine, créant une poche riche en résidus chargés positivement. **b)** Site de fixation de l'ATP situé à l'interface entre deux monomères. **c)** Modèle illustrant le mécanisme d'ouverture du canal (flèches noires).

1.2.1 SYNTHESE ET TRAFIC DES RECEPTEURS P2X

La régulation de l'activité biologique des récepteurs est dépendante de leurs synthèses, leurs adressages, leurs recyclages et leurs dégradations (pour revue (20)).

L'expression fonctionnelle des récepteurs P2X nécessite leur oligomérisation ainsi que des modifications post-traductionnelles. Comme de nombreuses protéines, les P2XR sont glycosylés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi avant d'être adressés à la membrane plasmique *via* des vésicules dépendantes des protéines de la famille des SNAREs.

Les récepteurs P2X comprennent deux à six sites de N-glycosylation. Des études par mutagénèse dirigée ont suggéré qu'au minimum deux N-glycosylations au niveau de la boucle extracellulaire étaient nécessaires à leurs adressages à la membrane plasmique.

Les récepteurs P2X possèdent la séquence consensus YXXXK localisée dans la région C-terminale, au niveau juxtamembranaire. Le récepteur P2X7 possède, en plus, une région de 18 acides aminés riche en cystéines entre le second segment transmembranaire et ce site consensus (cf partie P2X7). Les récepteurs mutés dans cette région sont rapidement internalisés et dégradés dans le lysosome démontrant le rôle de cette séquence dans la stabilisation des récepteurs à la membrane.

1.2.2 MOBILITE DES RECEPTEURS

Récemment, il a été montré que les récepteurs P2X sont mobiles à la surface des cellules. Des expériences par quantum dot ont révélé que les récepteurs P2X2 et P2X4 ont une mobilité latérale et sont régulés de façon dynamique à la surface des neurones et des cellules gliales après une stimulation à l'ATP (21 , 22). Richler et coll. ont observé que la co-expression de VILIP-1 (Visinin-like protein) et de P2X2 augmente la mobilité latérale de P2X2 (21). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène demeurent peu connus.

1.2.3 MULTIMERISATION

Les récepteurs P2X sont des multimères fonctionnels après association de trois sous-unités. Après traitement par des agents chimiques pontants et analyse par gels SDS-PAGE, Nicke et coll. ont mis en évidence pour la première fois, l'association en homotrimères des récepteurs P2X1 et P2X3. L'assemblage de ces sous-unités dans le réticulum endoplasmique est indispensable à l'expression membranaire des récepteurs (23). Cette architecture a ensuite été

confirmée par microscopie à force atomique (24), par microscopie électronique, par FRET (25 , 26) et par la résolution de la structure cristallographique du récepteur canal P2X4 (19).
Six des sept P2XR ont la capacité de former des homotrimères fonctionnels (à l'exception de P2X6). L'interaction entre les sous-unités fait certainement appel à un motif critique situé dans le segment transmembranaire 2 car la délétion de ce domaine aboutit à une absence d'assemblage des sous-unités. Les récepteurs P2X, comme de nombreux canaux ioniques, peuvent être constitués d'hétérotrimères. Torres et coll. ont démontré l'existence d'hétérotrimères et identifié les combinaisons possibles (Tableau 1) (27).

	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
P2X1	+	+	+	+	+	+	-
P2X2		+	+	+	+	+	-
P2X3			+	-	+	-	-
P2X4				+	+	+	+
P2X5					+	+	-
P2X6						-	-
P2X7							+

Tableau 1 : Association des sous-types des récepteurs P2X pour former des homo ou des hétérotrimères.
Les signes + indiquent que l'association entre ces sous-types a été mis en évidence biochimiquement et/ou électrophysiologiquement. Les signes – indiquent qu'aucune association n'a été observée (modifiée de (27)).

Récemment, la formation d'hétéromères de P2X7 avec la sous-unité P2X4 a été établie par des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules transfectées et dans des macrophages primaires dérivés de la moelle osseuse. Cette association constitue un récepteur fonctionnel présentant des réponses électrophysiologiques différentes des homotrimères P2X7 et P2X4 (28). Cependant, l'existence de ces hétérotrimères est remise en question par une nouvelle étude qui suggère qu'il s'assemble principalement en homotrimères.
En 2014, Antonio et coll. ont mis en évidence l'existence de récepteurs P2X constitués de trois sous-unités différentes par microscopie à force atomique. Dans les cellules de Leydig, ces récepteurs sont formés des sous-unités P2X2/P2X4/P2X6 (29).
La composition des récepteurs P2X régit leur fonction. Les propriétés fonctionnelles de ces

récepteurs sont également dépendantes des isoformes des différentes sous-unités offrant de nouvelles pistes d'investigations (30).

1.2.4 PHARMACOLOGIE DES RECEPTEURS P2X

Ces récepteurs sont des canaux ioniques activés suite à la fixation de leur ligand naturel : l'ATP. Leur activation conduit à l'ouverture d'un canal perméable aux cations monovalents Na^+, K^+ et au cation divalent Ca^{++}. La stimulation de ces récepteurs entraîne un influx rapide de sodium et de calcium et un efflux de potassium. Cette activation est responsable d'une augmentation du calcium intracellulaire consécutive à l'influx de calcium ainsi qu'à l'activation de canaux calciques suite à la dépolarisation membranaire (31). Certains sous-types sont également perméables aux anions tel que le chlore.

Lors d'une stimulation prolongée à l'ATP, les récepteurs P2X2, P2X4, P2X5 et P2X7 subissent un changement conformationnel aboutissant à la formation d'un pore non sélectif laissant passer des ions de grandes tailles tels que le $NMDG^+$ (N-methyl-D-glucamine ; 196 Da), le YO-PRO-1^{2+} (dérivé du propidium ; 376 Da). Les mécanismes moléculaires associés à la transition canal/pore sont peu connus.

Par ailleurs, il existe une variabilité temporelle dans la désensibilisation des récepteurs P2X. En effet, les P2X1 et P2X3 sont rapidement désensibilisés (de l'ordre de la milliseconde) tandis que les P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 sont désensibilisés plus lentement. Le récepteur P2X7 présente la particularité d'être peu ou pas désensibilisé (Figure 5) (32).

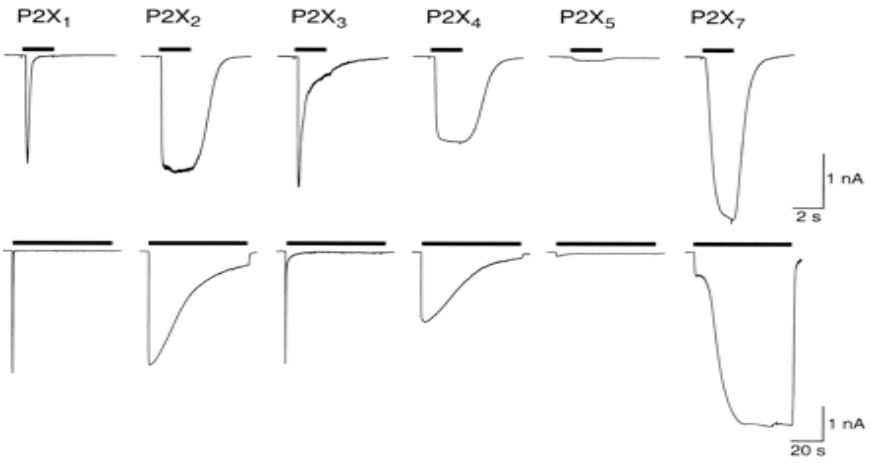


Figure 5 : Désensibilisation des récepteurs P2X.
Enregistrements éléctrophysiologiques des courants entrants des récepteurs P2X après ajout d'ATP en fonction du temps (32)

Les récepteurs P2X diffèrent également par leur sensibilité à l'ATP. Tandis que les récepteurs P2X1 et P2X3 ont une forte affinité pour l'ATP avec un EC50 de 1 micromolaire, les autres récepteurs présentent une moindre affinité avec des EC50 allant de 10 à 100 micromolaires pour le P2X7R. De nombreux agonistes et antagonistes des récepteurs P2X ont été caractérisés. Cependant, ces agents chimiques ne sont pas spécifiques d'une sous-unité donnée.

Le Bz-ATP est considéré comme un agoniste des récepteurs P2X7 et P2X1. L'α β-MeATP, un analogue de l'ATP active les récepteurs P2X1 et P2X3 à des doses plus faibles que les autres récepteurs. Enfin, d'autres agonistes tels que le 2-MeSATP ou l'ATPγS sont utilisés pour stimuler les récepteurs P2X bien qu'ils ne soient pas spécifiques d'une sous-unité donnée.

A ce jour, de nombreux antagonistes ont été décrits. En 1992, la découverte du premier antagoniste, la suramine a permis de confirmer l'existence d'une neurotransmission par l'ATP. Cependant, cet antagoniste n'est pas spécifique d'un récepteur.

Le TNP-ATP, un dérivé de nucléotides, est spécifique des récepteurs P2X1 et P2X3. D'autres agents chimiques ont été caractérisés tels que le PPADS, le bleu de coomassie ou encore l'ATP oxydé. Ces différents antagonistes présentent une spécificité variable en fonction des sous-types de P2X (33).

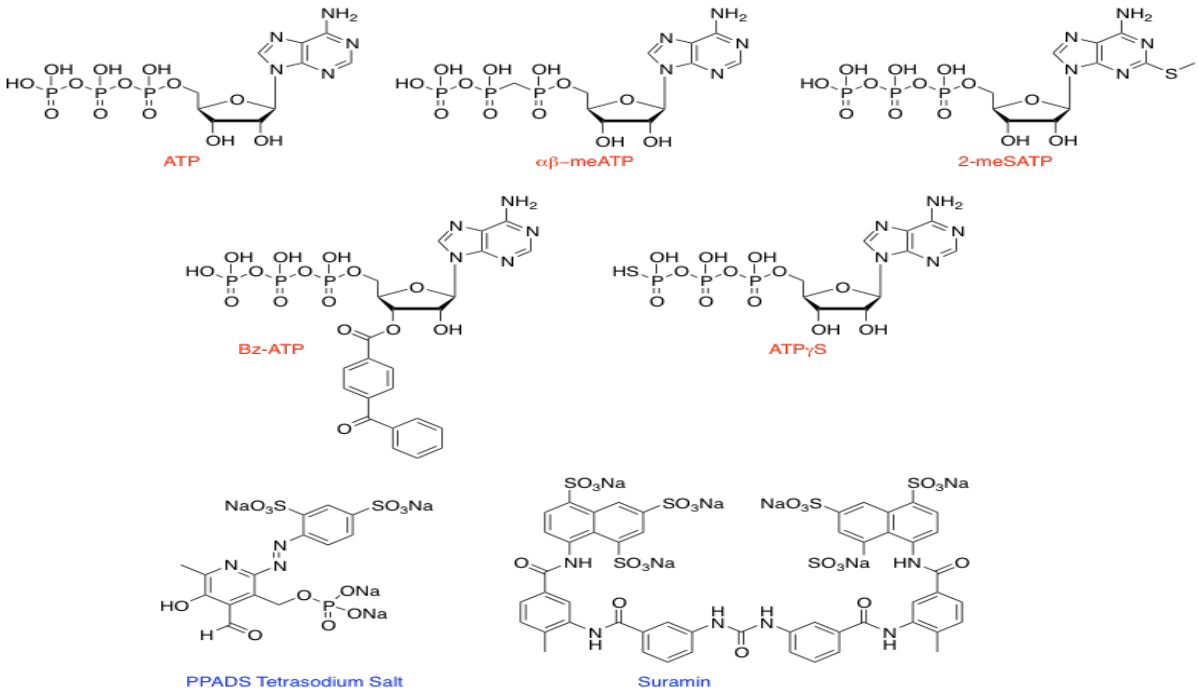


Figure 6 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs P2X (Modifiée de (34)).

En rouge les agonistes et en bleu les antagonistes.

1.2.5 DISTRIBUTION ET FONCTIONS DES P2X

Les récepteurs P2X présentent une large distribution tissulaire et participent à de nombreux processus physiologiques tels que la neurotransmission, la réponse inflammatoire ou encore la nociception (pour revue (35)). Le récepteur P2X1 a été initialement cloné à partir des canaux déférents de rat. Ce récepteur est largement exprimé dans les muscles lisses lui attribuant un rôle dans la contraction contrôlée par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique ainsi que dans de nombreux types cellulaires tels que les plaquettes sanguines. Les souris déficientes en P2X1 présentent un défaut de vasoconstriction et de coagulation suggérant son implication dans l'agrégation plaquettaire et dans le processus thrombotique. D'autre part, les souris mâles $P2X1^{-/-}$ sont infertiles suite à un défaut de contraction des canaux déférents empêchant le sperme d'atteindre le liquide séminal (36). La transmission synaptique purinergique implique principalement les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X6 lesquels sont majoritaires dans le système nerveux. Les souris invalidées pour le gène P2X2 présentent une anomalie du péristaltisme intestinal attribué à un défaut de transmission synaptique dans le plexus myentérique.

Le récepteur P2X3 est exprimé au niveau spinal. Sa localisation pré-synaptique semble intervenir dans la libération du glutamate par les neurones afférents primaires. Par ailleurs, P2X3 est également retrouvé dans les zones cérébrales impliquées dans la douleur et plus précisément dans une sous-population de neurones sensoriels dont une large proportion sont des neurones nociceptifs (environ 90%). Les souris invalidées pour le gène P2X3 présentent une diminution de la nociception au test de douleur (test au formol). De même, P2X3 participe également à la nociception mécanique. Les épithéliums étirés tel que l'urothélium entraînent une libération d'ATP qui active ce récepteur. Les souris invalidées présentent également une allodynie mécanique diminuée. D'autre part, P2X2 et P2X3 sont souvent co-localisés et sont connus pour former des hétérotrimères. Les souris doubles KO pour ces deux gènes présentent un phénotype identique aux souris KO pour le gène P2X3. Le rôle de P2X3 dans la nociception en fait ainsi une cible thérapeutique. L'A-317491, un antagoniste spécifique de P2X3 et des hétéromères P2X2/3, a démontré son efficacité analgésique sur des modèles animaux de neuropathies (37).

Le gène du récepteur P2X4 est à proximité du gène codant le récepteur P2X7 suggérant qu'ils dérivent du même gène par duplication. L'expression de P2X4 est sous le contrôle du facteur de transcription hématopoïétique GATA-2 (38). Le récepteur P2X4 a une distribution tissulaire très large et est très exprimé dans le système nerveux central et périphérique. Son

rôle dans la douleur chronique neuropathique et la douleur inflammatoire n'est plus à démontrer.

Dans un modèle d'allodynie, la ligation de nerf a pour conséquence une augmentation de l'expression protéique de P2X4 sur les cellules microgliales. De plus, l'inhibition de la production de P2X4 par des ARN interférents spécifiques entraîne une diminution de l'allodynie. Trois lignées de souris invalidées pour le gène P2X4 ont permis de démontrer qu'il y avait une diminution de l'allodynie provoquée par une lésion nerveuse, ou encore une diminution de la réponse à des tests de douleur (injection d'ATP, ou test au formol). La réduction de la douleur inflammatoire chez ces souris serait due à une diminution de la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2), un médiateur central impliqué dans la douleur, qui stimule la sécrétion du brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (39). En effet, les macrophages P2X4-/- présentent un défaut de synthèse de PGE2 suite à une stimulation à l'ATP, contrairement aux contrôles (40). Au niveau cardiaque, les souris sur-exprimant le P2X4 humain ont présenté une augmentation de la contraction des cardiomyocytes (41). De plus, dans un modèle de souris atteintes de cardiomyopathie, la surexpression de P2X4 a révélé une nette diminution de la progression de la pathologie ainsi qu'une espérance de vie deux fois supérieure aux souris contrôles. Actuellement, le récepteur P2X4 est considéré comme une cible thérapeutique potentielle dans le cadre des cardiomyopathies et des infarctus du myocarde (41).

Le récepteur P2X5 est retrouvé dans de nombreux tissus (cerveau, muscle, peau). De nombreuses analyses suggèrent que la stimulation de P2X5 par l'ATP inhibe la prolifération cellulaire et est responsable de la différenciation des cellules musculaires squelettiques et des kératinocytes. De plus, P2X5 jouerait un rôle dans la régénération des cellules musculaires squelettiques.

Le récepteur P2X6 présente la particularité de ne former que des hétérotrimères notamment avec P2X2 et P2X4. A l'heure actuelle, plusieurs isoformes de P2X6 ont été caractérisées et ont des profils d'expression différents.

A ce jour, des souris invalidées pour le gène P2X5 et P2X6 n'ont pas encore été produites.

1.3 LE RECEPTEUR P2X7

1.3.1 GENE ET ISOFORMES

Le récepteur P2X7 a été cloné et séquencé pour la première fois chez le rat en 1996, puis chez l'Homme en 1997. Le gène codant le récepteur P2X7 est situé sur le chromosome 5 chez la souris et sur le chromosome 12 chez l'homme et le rat. Il est constitué de 13 exons. La protéine P2X7 humaine, nommée dans un premier temps P2Z est composée de 595 acides aminés. Une sous-unité P2X7 est constituée d'une courte région N-terminale cytosolique, de deux segments transmembranaires, d'une large boucle extracellulaire et d'une longue partie C-terminale cytosolique de 240 acides aminés qui le distingue des autres récepteurs P2X.

A ce jour, 10 isoformes du P2X7R allant du P2X7A à P2X7J ont été identifiées chez l'Homme. La forme dite classique P2X7A est constituée de 13 exons. Les autres isoformes sont issues d'un épissage alternatif et se caractérisent par l'ajout ou la perte d'exons ou la présence d'un codon stop prématuré dû à l'insertion d'introns dans la séquence codante (P2X7B ; P2X7C ; P2X7E ; P2X7G) (42 , 43).

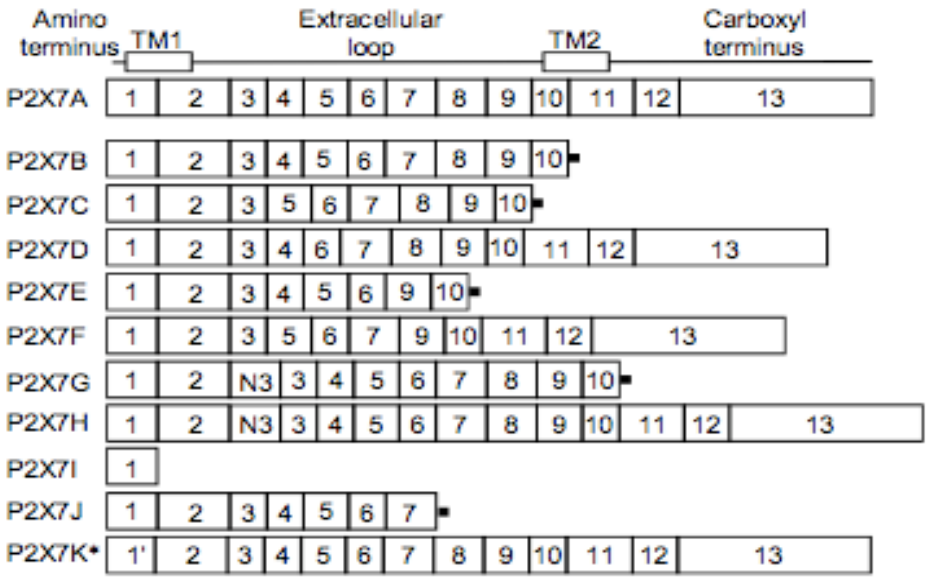


Figure 7 : Isoformes du P2X7R identifiés.
Ensemble des isoformes de P2X7 caractérisé à ce jour chez l'Homme (P2X7A à P2X7J)

L'isoforme B est exprimée dans de nombreux types cellulaires notamment les lymphocytes T régulateurs FoxP3+. Cette isoforme tronquée dans sa partie C-terminale présente une variation de 18 acides aminés dans son segment transmembranaire 2. En 2010, l'équipe de di

Virgilio a mené une étude permettant de comparer les caractéristiques de l'isoforme B par rapport à P2X7A ainsi que l'effet de l'hétérotrimérisation de ces formes. La stimulation au Bz-ATP de cellules HEK293 transfectée par l'isoforme B entraîne une réduction de la formation du canal ionique, une incapacité à former le pore non sélectif ainsi qu'une absence d'apparition de vésicules à la surface cellulaire. De manière surprenante, les hétérotrimères constitués de P2X7A/B répondent différemment à une stimulation au Bz-ATP. En effet, cette co-expression potentialise les réponses du récepteur à une stimulation au Bz-ATP s'illustrant par une augmentation de l'influx de Ca^{++}, une capacité plus importante à former le pore ainsi qu'une accélération de la formation de « blebs » et la mort cellulaire (44).

Les isoformes P2X7i et P2X7J sont non fonctionnelles. Le variant P2X7J présente une délétion totale de la partie C-terminale et du segment transmembranaire 2 ainsi qu'une délétion partielle de la boucle extracellulaire. Bien que la stimulation de cette isoforme par du Bz-ATP entraîne une légère augmentation du calcium intracellulaire, celle-ci est incapable de former le pore non sélectif et d'induire une mort par apoptose. Bien que non fonctionnelle à l'état d'homotrimère, cette isoforme est capable de moduler les réponses du P2X7A en le liant. En effet, Feng et coll. ont démontré que la co-expression des isoformes P2X7A/P2X7J entraîne la formation d'hétérotrimères P2X7A/P2X7J ayant perdu la capacité de former le pore non sélectif et d'induire la mort par apoptose. La co-expression de ces isoformes dans des tissus issus de cancer du col de l'utérus a poussé les auteurs à discuter de l'impact de l'inhibition de la voie de mort dans la croissance des cellules cancéreuses (45).

Chez la souris, les isoformes P2X7A et P2X7K diffèrent par leur sensibilité à l'ATP et leur expression tissulaire. La production de souris invalidées pour le P2X7 a permis la découverte de l'isoforme K. En effet, les souris *Glaxo* ont été invalidées par insertion du gène LacZ dans l'exon 1 du gène P2X7. De manière inattendue, les lymphocytes T ont conservé une réponse importante à l'ATP. Ces études ont permis de caractériser l'isoforme K dont la sensibilité à l'ATP est accrue comparativement à l'isoforme A (43).

Plus récemment, une équipe a mis en évidence deux isoformes nommées P2X7 13B et P2X7 13C tronquées dans leurs parties C-terminales. Ces isoformes présentent la particularité d'être exprimées dans de nombreux tissus de la souris KO P2X7 de *Pfizer*. Les tests physiologiques sur ces deux isoformes ont montré que celles-ci sont fonctionnelles mais très peu exprimées à la surface des cellules (46).

1.3.2 EXPRESSION

Le récepteur P2X7 est principalement exprimé par les cellules d'origine hématopoïétique tels que les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, les cellules dendritiques. Celui-ci est également localisé dans les cellules du système nerveux central (microglie, oligodendrocytes, astrocytes, cellules progénitrices neurales…) et périphérique (cellules de Schwann, cellules gliales entériques).

La présence du récepteur P2X7 sur les neurones reste actuellement très débattue. Les premières études par hybridation *in situ* ont révélé la présence d'ARNm de P2X7 dans le cerveau mais pas sur les neurones. Des études réalisées plus tard ont suggéré la présence d'ARNm de P2X7 dans les neurones du cortex, dans les couches de cellules pyramidales de l'hippocampe CA1, CA3 et CA4, dans les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus ainsi que dans les motoneurones de la moelle épinière. Par ailleurs, des expériences d'immunohistochimie ont démontré la présence protéique de P2X7 sur les neurones mais cette étude a été invalidée par de nombreux groupes qui ont montré que ce marquage était non spécifique car présent sur des coupes de cerveau provenant de souris $P2X7^{-/-}$.

Plus récemment, le projet GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas) de l'université Rockfeller consistant à exprimer la GFP sous le contrôle du promoteur de P2X7 a montré que le récepteur serait exprimé dans l'hippocampe (gyrus denté et région CA3) et l'hypothalamus.

Le récepteur est également exprimé sur de nombreux autres types cellulaires tels que les ostéoblastes, les hépatocytes ou encore les glandes salivaires sous-maxillaires.

1.3.3 MOBILITE

Depuis quelques années, l'intérêt des chercheurs s'est porté sur l'étude des déplacements des récepteurs P2X7 à la surface des cellules. Des études ont démontré que la localisation du récepteur dans certaines régions de la membrane plasmique, notamment dans les radeaux lipidiques, influence sa fonction ainsi que la voie de signalisation mise en jeu.

Ainsi, l'équipe de Renner a étudié la diffusion du récepteur P2X7 par la technique PALM (microscopie par localisation photo-activée). Cette technique de microscopie à fluorescence permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de 20 nm. Leurs résultats suggèrent un mécanisme probablement commun à tous les P2XR concernant la dynamique des diffusions de ces récepteurs. Ainsi, la fixation de l'ATP au récepteur entraînerait une augmentation de sa mobilité et aboutirait à un regroupement de ces récepteurs à la surface des cellules (47).

1.3.4 PROPRIETES ET PHARMACOLOGIE

L'activation du récepteur P2X7 par une exposition brève à l'ATP conduit à la formation d'un canal cationique similaire aux autres récepteurs P2X. Cependant, l'exposition prolongée à l'ATP conduit à la formation d'un pore non sélectif rendant la membrane perméable à des molécules de haut poids moléculaire allant jusqu'à 900Da. Selon les types cellulaires, P2X7 a la propension à former un pore cationique ou anionique (48 , 49).

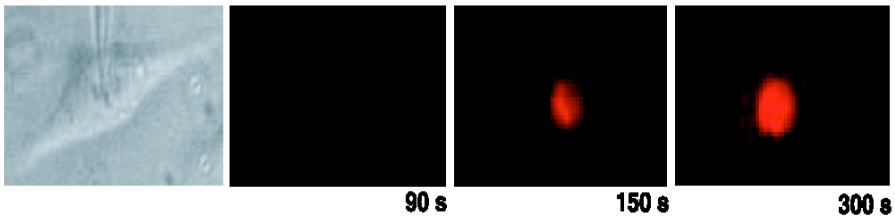


Figure 8 : Visualisation du pore non sélectif du P2X7R par incorporation de bromure d'éthidium après application d'ATP (50).

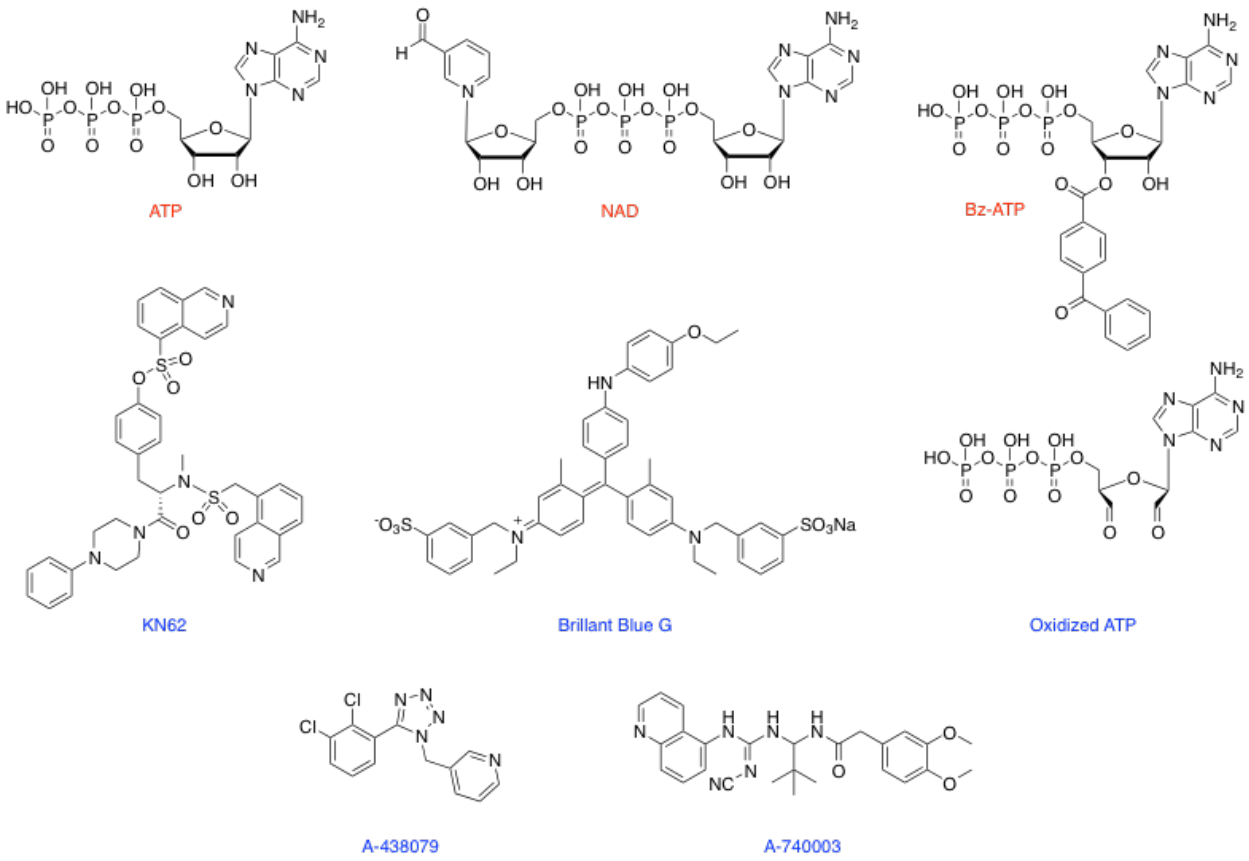


Figure 9: Principaux agonistes et antagonistes du récepteur P2X7. Modifié de (51)

En rouge, les agonistes de P2X7R et en bleu les antagonistes.

1.3.4.1 Les agonistes du récepteur P2X7

Le récepteur P2X7 présente la particularité d'être très peu affin pour l'ATP avec un EC50 de 100 à 500µM selon le type cellulaire. Le Bz-ATP est un agoniste 10 à 30 fois plus efficace que l'ATP. Le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) est un ligand naturel du récepteur P2X7. Seman et coll. ont démontré que l'activation du récepteur P2X7 est due à une ADP-ribosylation de la sous-unité de P2X7. C'est l'enzyme ecto-ADP-ribosyltransférase, présente à la surface des lymphocytes T de souris qui est responsable du transfert d'un groupement ADP ribose du NAD sur l'arginine 125 située à l'interface entre deux sous-unités de P2X7. Le NAD est donc un activateur naturel qui possède une efficacité 100 fois supérieur à celle de l'ATP avec un EC50 de l'ordre du micromolaire. Cependant, ce mécanisme très original de stimulation de P2X7R n'a pour l'instant été décrit que chez la souris (52 , 53).

1.3.4.2 Les antagonistes du récepteur P2X7

De nombreux antagonistes du récepteur P2X7 ont été décrits. Parmi eux, l'A438079 et l'A740003 sont des antagonistes compétitifs et sélectifs. Ils inhibent de façon réversible les récepteurs P2X7 humains et murins sans intervenir sur les autres récepteurs P2X (54 , 55 , 56). L'ATP oxydé (o-ATP) est un antagoniste des récepteurs P2X1, P2X2 et P2X7. Cependant une pré-incubation de 1 à 2 heures entraîne une inhibition spécifique et irréversible du récepteur P2X7 car il le lie de façon covalente. Le KN-62 est à l'origine un inhibiteur sélectif de la Ca^{++}/Calmoduline Kinase de type II. Néanmoins, celui-ci agit également en antagoniste non compétitif du récepteur P2X7 humain (IC50 50nM) et murin (IC50 10µM). Il présente la particularité d'être inactif sur le récepteur de rat. Le Blue Brillant G (BBG) est un antagoniste efficace du récepteur. Il est assez sélectif étant donné qu'il agit sur P2X7R dès 10nM alors que les autres récepteurs P2X sont inhibés à des doses plus fortes de l'ordre du millimolaire. Au cours de ces dernières années, d'autres antagonistes du récepteur P2X7 ont été caractérisés (l'AZ11645373, l'AZ10606120, le GSK314181A et l'A-804598) (57 , 58).

1.3.4.3 Les modulateurs allostériques du récepteur P2X7

Récemment, il a été proposé que la clémastine, un antihistaminique H1, puisse jouer le rôle de modulateur allostérique pour ce récepteur. Celle-ci augmenterait la sensibilité des récepteurs humains à l'ATP en se liant à la boucle extracellulaire (59).

L'ivermectine, un régulateur allostérique connu de P2X4 a longtemps été utilisé pour

discriminer les récepteurs P2X4 du P2X7. Cependant, il semblerait que cet anti-parasitaire régule également positivement les courants entrant du P2X7 humain mais n'aurait pas d'action sur la forme murine (60).

1.3.5 STRUCTURE PROTEIQUE : DOMAINES ET MUTATIONS

Le récepteur P2X7 se distingue des autres récepteurs P2X par sa longue partie C-terminale. En 2001, Denlinger et coll. ont effectué un alignement de séquences révélant une forte homologie avec le domaine de mort des récepteurs au TNF ainsi qu'un domaine d'interaction avec le lipopolysaccharide (LPS) par analogie avec la LBP (LPS binding protein) (17). De plus, un motif PXXP pourrait permettre l'interaction aux protéines possédant un domaine SH3.

Deux études de protéomique ont été faite par co-immunoprécipitation du P2X7R (de rat et d'homme) à l'aide d'un anticorps monoclonal reconnaissant la partie extracellulaire du récepteur, suivi d'une analyse en spectrométrie de masse. La première étude effectuée sur des cellules HEK transfectées avec un plasmide codant le P2X7R de rat a permis d'identifier 11 partenaires d'interaction du récepteur P2X7, en absence de toute stimulation. Ces protéines sont de nature différentes. Le P2X7R serait associé à une protéine de la matrice extracellulaire (la laminine α3), trois protéines du cytosquelette (β actine, superviline, α actinine), la sous-unité β2 d'une intégrine, la protéine adaptatrice MAGuK, trois protéines chaperones (Hsp90, Hsp70, Hsc71) et deux protéines impliquées dans la transduction de signaux, la kinase PI4K et la tyrosine phosphatase RPTPβ (Figure 10) (18). Cette phosphatase serait responsable de la déphosphorylation de la tyrosine 343 du P2X7R suite à son activation et influencerait la fonction canal du P2X7 de rat ainsi que son interaction avec les éléments du cytosquelette aboutissant à une altération du phénomène de bourgeonnement vésiculaire (18).

La seconde étude menée sur des monocytes THP1 activés a démontré l'association du P2X7R endogène avec la myosine II non musculaire ainsi qu'avec différentes protéines trouvées dans la première étude (61). Ces études témoignent de l'appartenance du P2X7R à un important complexe protéique.

En 2008, un site d'interaction à la calmoduline a été mis en évidence par Roger et coll. Ce site situé dans la région C-terminale du récepteur n'est retrouvé que dans le récepteur P2X7 de rat. Il est impliqué dans de nombreux phénomènes dont le bourgeonnement vésiculaire (cf Partie Fonctions de P2X7R) (62).

En plus de son rôle dans la signalisation cellulaire, la partie C-terminale est indispensable à la fonction canal et pore du récepteur. La mutation du résidu P451L dans le domaine de mort,

entraîne une nette réduction de la formation du pore (63).

Par ailleurs, les travaux de l'équipe de Zemkova (64) ont caractérisé l'effet des plusieurs mutations dans les domaines transmembranaires sur le P2X7R de rat. Ils ont mis en évidence que :

- les substitutions de Y40, F43 et D352 en alanine réduisent l'adressage du P2X7R à la membrane. Le mutant D352 est non fonctionnel.

-les mutants Y40A et F43A exprimé à la membrane n'ont plus la capacité à former le pore non sélectif.

- Les mutants L341A et G345A sont adressés à la membrane cellulaire mais présentent une diminution de la formation du pore.

Cette étude démontre que les résidus Y40 et F43 situés dans le segment transmembranaire 1 sont indispensables à la fonction canal du P2X7R tandis que la région située dans le segment transmembranaire 2 contrôle la formation et la taille du pore non sélectif (64).

Les travaux de Gonnord et coll. ont montré le rôle critique de résidus situés dans la partie C-terminale de P2X7 dans l'adressage du récepteur au DRMs. En effet, par des expériences de mutagénèse dirigée les auteurs ont établis que les cystéines 477, 479, 482, 498, 499, 506, 572, 573 sont palmitoylées. La mutation de ces cystéines en alanines entraîne une nette diminution de l'expression du P2X7R dans les DRMs. La localisation cellulaire de ces formes mutées a permis de montrer que l'absence de palmitoylation entraîne la rétention du P2X7R dans le RE et sa dégradation par les lysosomes et les protéasomes (65).

En plus des différentes isoformes caractérisées, le P2X7R présente un important polymorphisme. A ce jour, 32 SNP ont été identifiés et certains d'entre eux ont été caractérisés. Ces SNP peuvent produire des gains ou des pertes de fonction et sont pour certains associés à des pathologies (Tableau 2).

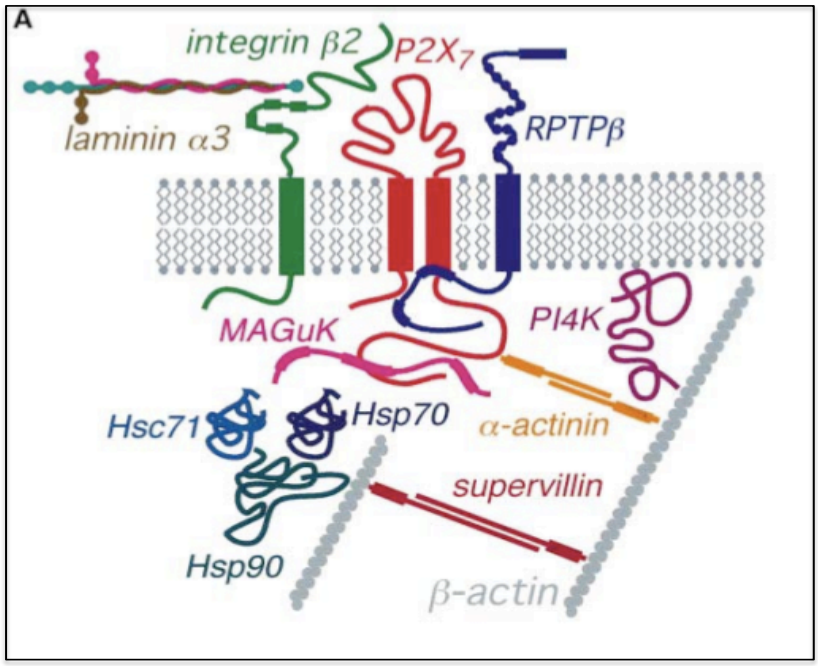


Figure 10 : Protéine interagissant avec le P2X7R. De (18).

SNP	Mutation	Effet
rs3751143 1513A>C	Glu^{496} en Ala	Absence de pore
rs1653624 1729T>A	Ile^{568} en Asn	Problème de trafic Non fonctionnel
rs7958316 946G>A	Arg^{307} en Glu	Bien adressé Non fonctionnel
rs2230911 1096C>G	Ser^{357} en Thr	Diminution des fonctions canal et du pore
rs2230912	Gln^{460} en Arg	Augmentation des courants, du pore et de la sécrétion IL-1β
rs1718119	Ala^{348} en Thr	Augmentation des courants et du pore
rs208294 489C>T	His^{155} en Tyr	Augmentation des courants, de l'influx de Ca^{++} et du pore
rs17525809	Ala^{76} en Val	Augmentation des courants, de l'influx de Ca^{++} et du pore

Tableau 2: Caractérisation de SNP du gène codant le récepteur P2X7. Modifié de (66)

1.3.6 FONCTIONS DU RECEPTEUR P2X7

1.3.6.1 Formation du pore non sélectif

Selon la durée de stimulation à l'ATP, le récepteur P2X7 peut adopter deux stades de perméabilité. L'état O1 (ou I1) fait référence à l'ouverture du canal cationique conséquente à une courte activation. Cependant, l'exposition prolongée à l'ATP induit un état O2 (ou I2) caractérisé par la formation d'un pore non sélectif laissant passer des molécules de poids moléculaire compris entre 400Da et 900Da dans les lymphocytes.

Deux types de pores ont été découverts. Le premier laisse passer des molécules cationiques tels que le NMDG+, le YO-PRO1 ou le bromure d'éthidium. Le second type est un pore anionique perméable notamment à la carboxyfluorescéine (376Da), au Lucifer Yellow (443Da) et au fura-2 (636Da) (48 , 49).

Les mécanismes de la formation du pore cationique restent très controversés et deux théories s'opposent actuellement. La première hypothèse suggère que la formation du pore serait due à des propriétés intrinsèques du récepteur. Suite à son activation prolongée, celui-ci subit un changement de conformation aboutissant à sa dilatation progressive. La seconde théorie propose qu'une autre protéine, qui serait activée par P2X7R, et permettrait le passage de molécules de haut poids moléculaire.

En faveur de la première hypothèse, Yan et coll. ont proposé un modèle mathématique dit asymétrique. Une première molécule d'ATP se fixerait à une sous-unité du récepteur entraînant une asymétrie du récepteur et l'augmentation de son affinité pour l'ATP. Dés lors, une seconde molécule d'ATP pourrait se fixer au récepteur conduisant à l'ouverture du canal. Enfin, une troisième molécule d'ATP lierait la troisième sous-unité et serait responsable d'une plus forte activation du P2X7R et de la formation du pore (67).

La seconde théorie attribue la formation du pore non sélectif à une autre protéine activée par P2X7. Marques-Da-Silva et coll. ont démontré que la colchicine inhibe la formation du pore sans affecter la fonction canal des récepteurs P2X7 et P2X2. Ces travaux supportent l'hypothèse qu'il existerait une voie différente menant à l'ouverture d'un pore sensible à la colchicine (68).

L'équipe de Surprenant a identifié un premier candidat appartenant à la famille des connexines : la pannexine-1. Cette protéine ne participe pas à la formation de jonctions communicantes mais est également capable de former un canal perméable à des molécules de poids moléculaires variables. Ainsi, de nombreux travaux ont montré que cet hémicanal serait responsable du pore. L'inhibition de la pannexine-1 par ARN interfèrent ou par le

peptide inhibiteur Panx10 bloque l'entrée de molécules fluorescentes suite à une stimulation du P2X7R par l'ATP (69). Cependant, l'inhibition de l'expression de la pannexine par invalidation du gène ne bloque pas le passage de molécules fluorescentes après stimulation à l'ATP (70 , 71). Ces résultats suggèrent que d'autres protéines peuvent être responsable de la formation du pore non sélectif.

L'anoctamine 6, une scramblase dépendante du Ca^{++}, est au centre de toutes les attentions. Dans leurs travaux, Ousingsawat et coll. ont montré par des expériences de co-immunoprécipitation, l'association physique de l'anoctamine 6 au récepteur P2X7. De plus, l'inhibition par des ARN interférents ou par l'invalidation du gène codant l'anoctamine 6 dans des macrophages de souris diminue de façon importante la formation du pore consécutive à des stimulations à l'ATP ou au Bz-ATP (72).

Ces deux théories s'accordent sur l'importance du segment transmembranaire 2 et de la partie C-terminale du récepteur. En effet, la mutation P451L affecte la formation du pore. Plus récemment, il a été montré que la construction de la protéine chimère P2X7 comprenant le segment TM2 de P2X1 bloque de façon drastique l'entrée de molécules fluorescentes (YO-PRO, PI, DAPI) (73). De plus, les travaux de Jindrichova et coll. démontrent que les résidus L341 et G345 situés dans le segment transmembranaire 2 contribuent à la formation du pore (64).

Ainsi de nombreuses données s'accordent sur le rôle essentiel du second segment transmembranaire dans la formation du pore.

Par ailleurs, Gu et coll. ont montré que le récepteur s'associe à la myosine non musculaire II (MNMII) en absence de toute stimulation. Suite à la stimulation du P2X7R, la MNMII se dissocie du récepteur. Afin d'étudier le rôle de la MNMII sur les fonctions du récepteurs, les auteurs ont utilisé des shARN ciblant la MNMII. Les résultats ont montré que l'inhibition de cette protéine est responsable d'une augmentation drastique de la fonction pore. Cette étude suggère qu'en liant le récepteur P2X7, la MNMII régule sa fonction pore (61).

Cependant, une étude montre qu'en présence du peptide antimicrobien LL-37, les récepteurs P2X7 tronqués dans leurs extrémités C-terminales forment tout de même un pore. Cette étude soutient donc l'hypothèse que la partie C-terminale du récepteur ne serait donc pas indispensable à la formation du pore non sélectif (74).

La partie C-terminale serait responsable de la dilatation du récepteur ou interagirait avec un complexe moléculaire responsable de la formation du pore.

D'autres études ont montré que la délétion des 18 acides aminées du domaine riche en cystéines juxtamembranaire de la partie C-terminale du récepteur ou une

concentration physiologique en sodium inhibe l'entrée de NMDG mais pas du YO-PRO-1. Ces résultats suggèrent qu'il existerait deux voies distinctes. La première serait intrinsèque au récepteur et la seconde ferait appel à d'autres protagonistes (75).

Ainsi les nombreuses contradictions concernant l'implication de la partie C-terminale pourraient être attribuées aux différents types cellulaires utilisés mais également à la formation de pores « différents ».

1.3.6.2 P2X7 et bourgeonnement vésiculaire (blebbing)

L'activation du récepteur P2X7 est à l'origine d'un phénomène appelé « blebbing ». En effet, l'application continue d'ATP est responsable de l'apparition de vésicules à la surface membranaire (Figure 11). Ce phénomène de bourgeonnement est induit très rapidement après l'ajout d'ATP et se traduit par un remaniement du cytosquelette.

La partie C-terminale du récepteur semble être impliquée dans l'apparition des vésicules. En effet, l'isoforme B, tronquée dans sa partie C-terminale perd sa capacité à former des blebs.

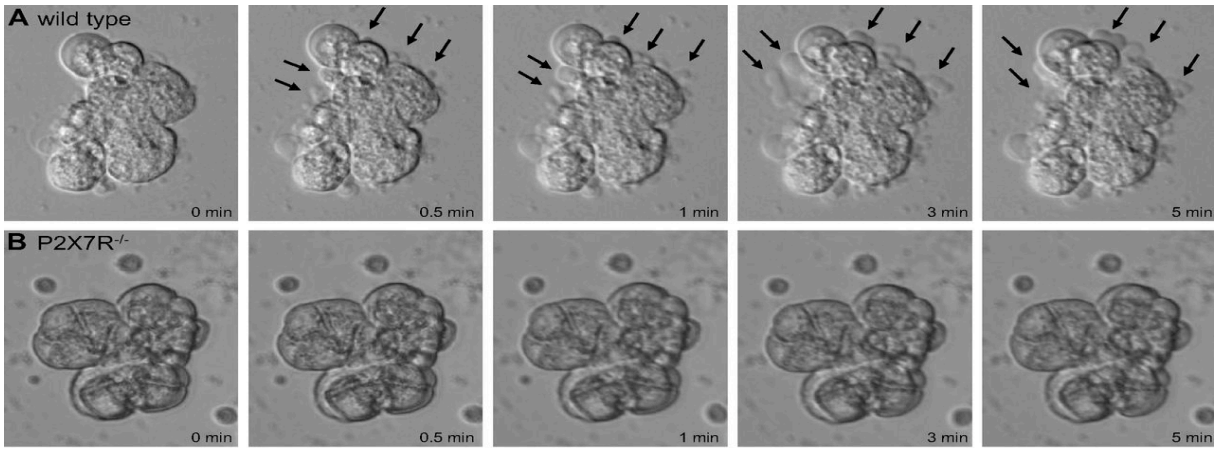


Figure 11 : La stimulation du P2X7R par l'ATP induit un phénomène de blebbing. (76).

Ce résultat conforte l'étude de Roger et coll. qui attribue l'apparition des blebs à l'interaction de la calmoduline avec cette région. En effet, l'inhibition de l'interaction de la calmoduline entraîne une diminution de l'apparition des vésicules (62). De plus, la formation de vésicules, dépendante de l'activation de P2X7, implique les protéines RhoA et RhoKinase (ROCK-1), la MAPKinase P38 et l'activation de la caspase 1 (77). L'apparition de ces vésicules est concomitante de l'augmentation du calcium intracellulaire. De nombreux auteurs attribuent ce phénomène aux prémices d'une mort par apoptose. Cependant, ce phénomène est réversible.

1.3.6.3 P2X7 dans la mort cellulaire

Le récepteur P2X7 est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire et régule des fonctions importantes comme la mort cellulaire. En effet, ce récepteur a tout d'abord été décrit comme un récepteur de mort. L'activation prolongée du récepteur peut conduire à la mort de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les thymocytes, les cellules progénitrices neurales, les cellules dendritiques (78 , 79 , 80). Le type de mort consécutif à l'activation du P2X7R reste discuté. En effet, suivant les auteurs l'activation du récepteur induit une mort par apoptose, par nécrose ou encore par aponécrose.

Les caractéristiques bien connues de la mort programmée par apoptose sont retrouvées rapidement après activation du récepteur P2X7. Notamment, le phénomène de blebbing ou encore l'exposition de la phosphatidylsérine à la face externe de la membrane plasmique sont des signes précoces d'apoptose. De ce fait, les auteurs en ont conclu que P2X7 était responsable d'une mort par apoptose. Or, ces différents phénomènes issus de l'activation de P2X7 sont réversibles.

D'autres études ont rapporté que l'activation de P2X7 entraîne une mort par nécrose de 50% des thymocytes par une voie dépendante des modules de MAPKinase ERK1/2 et des Src kinases conduisant *in fine* à une libération de la lactate déshydrogénase reflétant une perte de l'intégrité membranaire (78).

Cependant, son rôle dans la mort cellulaire reste complexe étant donné que ce récepteur est également impliqué dans la prolifération cellulaire (44).

1.3.6.4 P2X7 et inflammation

Le récepteur P2X7 est principalement étudié pour son implication dans l'inflammation.

L'inflammation correspond à un ensemble de réactions générées par l'organisme suite à une agression. Le processus inflammatoire peut être déclenché :

(1) Par des pathogènes. Ceux-ci sont détectés par des récepteurs ubiquitaires capables de reconnaître des motifs particuliers qui leurs sont associés appelés « Pathogen Associated Molecular Patterns » ou PAMP.

(2) Par des molécules libérées à la suite de lésions cellulaires. Ces molécules se comportent comme des signaux de dangers. Celles-ci sont appelées « Damage Associated Molecular Patterns » ou DAMP. L'ATP est considéré comme un DAMP rapidement disponible.

La reconnaissance des PAMP et des DAMP par les cellules s'effectue grâce à des récepteurs nommée PRR dont les plus connus sont les Toll Like Receptor (TLR). La stimulation de ces

récepteurs conduit *in fine* à l'activation de différents complexes multiprotéiques intracellulaires appelés inflammasomes. Ces complexes vont être responsables de la maturation et de la libération de cytokines pro-inflammatoires.

1.3.6.4.1 Inflammasome NLRP3 et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires

L'inflammasome NLRP3 (aussi nommé NALP3 ou cryopyrine), est à l'origine de la maturation et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires : pro- IL-1β et pro-IL-18.

Très brièvement, l'IL-1 appartient à une famille de cytokines pro-inflammatoires comprenant 11 membres (IL1F1 à IL1F11). L'IL-1β (ou IL1F2) est exprimée par de nombreuses cellules du système immunitaire. Sa liaison au récepteur à l'IL-1 stimule la voie du facteur de transcription NF-κB responsable de la production d'autres médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-6.

L'IL-1β ne possède pas de séquence signal et ne peut donc pas emprunter la voie de sécrétion classique des protéines. Elle est synthétisée sous la forme de pro-IL-1β et nécessite une étape de maturation supplémentaire pour être active.

1.3.6.4.1.1 Activation séquentielle de l'inflammasome

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est finement régulée et requiert deux signaux indépendants.

Le premier signal fait appel aux récepteurs TLR4, notamment stimulés par le LPS, et activent la voie de signalisation NF-κB. Cette voie conduit à l'augmentation de la transcription des gènes codant la pro-IL-1β qui s'accumulera dans le cytoplasme (Figure 12).

Le second signal aboutit à l'activation de l'inflammasome NLRP3, à la maturation et à la sécrétion de l'IL-1β et de l'IL-18. Ce complexe moléculaire est composé des protéines NLRP3, ASC et de la pro-caspase 1. Les domaines Leucin Rich Repeat (LRR) des molécules NLRP3 détectent les signaux de danger et s'oligomérisent par leurs domaines NACHT. Les domaines PYD de NLRP3 vont s'associer aux domaines PYD des protéines ASC. Les protéines adaptatrices ASC recrutent les pro-caspases 1, par leurs domaines CARD. Les pro-caspases 1 vont s'auto-activer en clivant leurs pro-domaines et être à l'origine de la maturation de la pro-IL-1β en IL-1β (Figure 13).

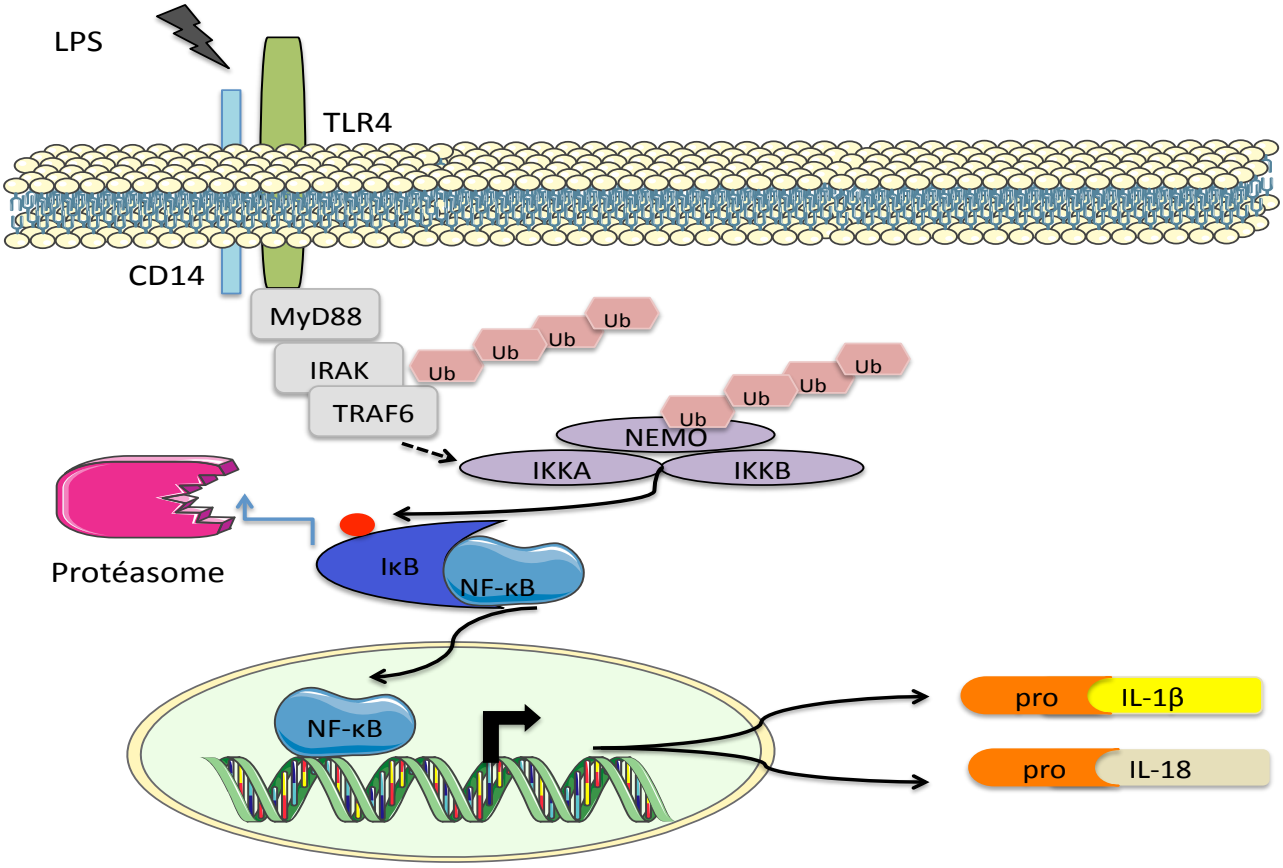


Figure 12 : Mécanisme de production de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18.

Le LPS se fixe au complexe TLR4-CD14 qui recrute la molécule MyD88. A son tour, MyD88 recrute les IRAKs qui interagissent avec TRAF6 qui est poly-ubiquitinylée. Cette cascade aboutit à la phosphorylation du complexe NEMO/IKKα/IKKβ et à la poly-ubiquitinylation de NEMO. Ce complexe activé phosphoryle IκB, ce qui inhibe son interaction avec NF-κB. IκB est ensuite dégradé par le protéasome. Le facteur de transcription de NF-κB va migrer dans le noyau et provoquer la transcription des gènes codant la pro-IL-1β et la pro-IL18.

1.3.6.4.1.2 Modèles d'activation de NLRP3 :

A l'état latent, ce complexe est inactif et nécessite donc le second signal pour être activé. Les mécanismes moléculaires responsables de l'activation de NLRP3 sont encore débattus bien que quatre modèles se dégagent des données de la littérature.

1) L'exposition aux métaux (amiante, silice..) peut être à l'origine de maladies inflammatoires. Ces particules sont phagocytées par les macrophages et sont adressées aux lysosomes. Ces particules vont entraîner la déstabilisation et la rupture membranaire des lysosomes qui libéreront leurs contenus dans le cytosol. De nombreux auteurs

s'accordent sur le rôle de la libération de la cathepsine B dans l'activation de l'inflammasome (81 , 82). Cependant, d'autres résultats ont montré que des macrophages déficients pour la cathepsine B peuvent activer la caspase 1, produire et libérer l'IL-1β en réponse à des agonistes ciblant NLRP3 (83). L'acidification du milieu pourrait être également un activateur. Par ailleurs, d'autres composés endogènes tel que les agrégats aβ produits dans la maladie d'Alzheimer peuvent induire l'activation de NLRP3, en suivant ce même modèle.

2) La production de ROS est un évènement très conservé dans l'évolution, en réponse à une infection. De nombreux agonistes de NLRP3 induisent la production de ROS. Des auteurs ont proposé que les ROS d'origine mitochondriale seraient responsables de l'activation de NLRP3 (84).
3) Un nouveau modèle d'activation est actuellement proposé. Le rôle de la mitochondrie dans l'activation de NLRP3 est au centre de l'attention. Une première étude a démontré que la libération mitochondriale de ROS active NLRP3 (84) tandis qu'une autre équipe suggère que c'est l'ADN mitochondrial libéré qui est responsable de cette fonction (85). En 2012, l'équipe d'Arditi a identifié les mécanismes impliqués dans cette réponse. Sous l'effet de signaux pro-apoptotique, l'ADN mitochondrial oxydé est libéré dans le cytosol. Les auteurs ont marqué l'ADN au BrdU et immunoprécipité NLRP3. Ils ont observé que l'ADN mitochondrial lie NLRP3 et active ce dernier (86).

Enfin, un dernier modèle démontre l'activation de NLRP3 par P2X7 (Figure 13).

4) Dans un contexte inflammatoire, les cellules peuvent libérer de l'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP active le récepteur P2X7 et a pour conséquence un efflux de potassium et un influx de sodium. Certains auteurs ont observé qu'une faible concentration intracellulaire de potassium conduit à l'activation de NLRP3 et de la caspase 1. A l'inverse, une forte concentration de potassium bloque la sécrétion d'IL-1β. P2X7 agirait sur l'inflammasome en diminuant la concentration de potassium intracellulaire. Par ailleurs, la stimulation par l'ATP de macrophages péritonéaux aboutit à l'activation de l'hémicanal pannexine 1, nécessaire à la sécrétion d'IL-1β mature (87). Il semblerait que P2X7 provoque l'activation du pore pannexine qui permettrait le passage des PAMP. Cependant, la stimulation de BMDM provenant de souris pannexine-/- par l'ATP montre, au contraire, que la pannexine n'est pas indispensable à l'activation de NLRP3 (88).

   L'exposition à la silice est également responsable de la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire. Ainsi, il n'est pas exclu que les métaux induisent la sécrétion d'IL-1β par

une voie dépendante de P2X7. En faveur de cette hypothèse, Moncão-Ribeiro et coll. proposent que P2X7 favoriserait la phagocytose de ces particules, la production de ROS nécessaires à la maturation de l'IL-1β (89). De plus, la stimulation de la lignée humaine THP-1 par des cristaux de silice ou des sels d'aluminium induit une libération importante d'ATP dans le milieu extracellulaire (5mM) et active P2X7, responsable de la stimulation de NLRP3 (90). Cependant, cette même étude montre que les BMDM P2X7-/- gardent leurs capacités à sécréter de l'IL-1β suite à une exposition aux cristaux de silice ou aux sels d'aluminium (90).

Enfin, dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de peptides amyloïdes toxiques est connue pour induire une libération d'IL-1β dépendante de P2X7 (91). (Cet aspect sera plus amplement développé dans la partie 1.3.7.1 Rôle du P2X7R dans les maladies du SNC.)

Les résultats récents montrent la complexité de ce système d'activation et semble indiquer que ces modèles ne sont pas indépendants les uns des autres.

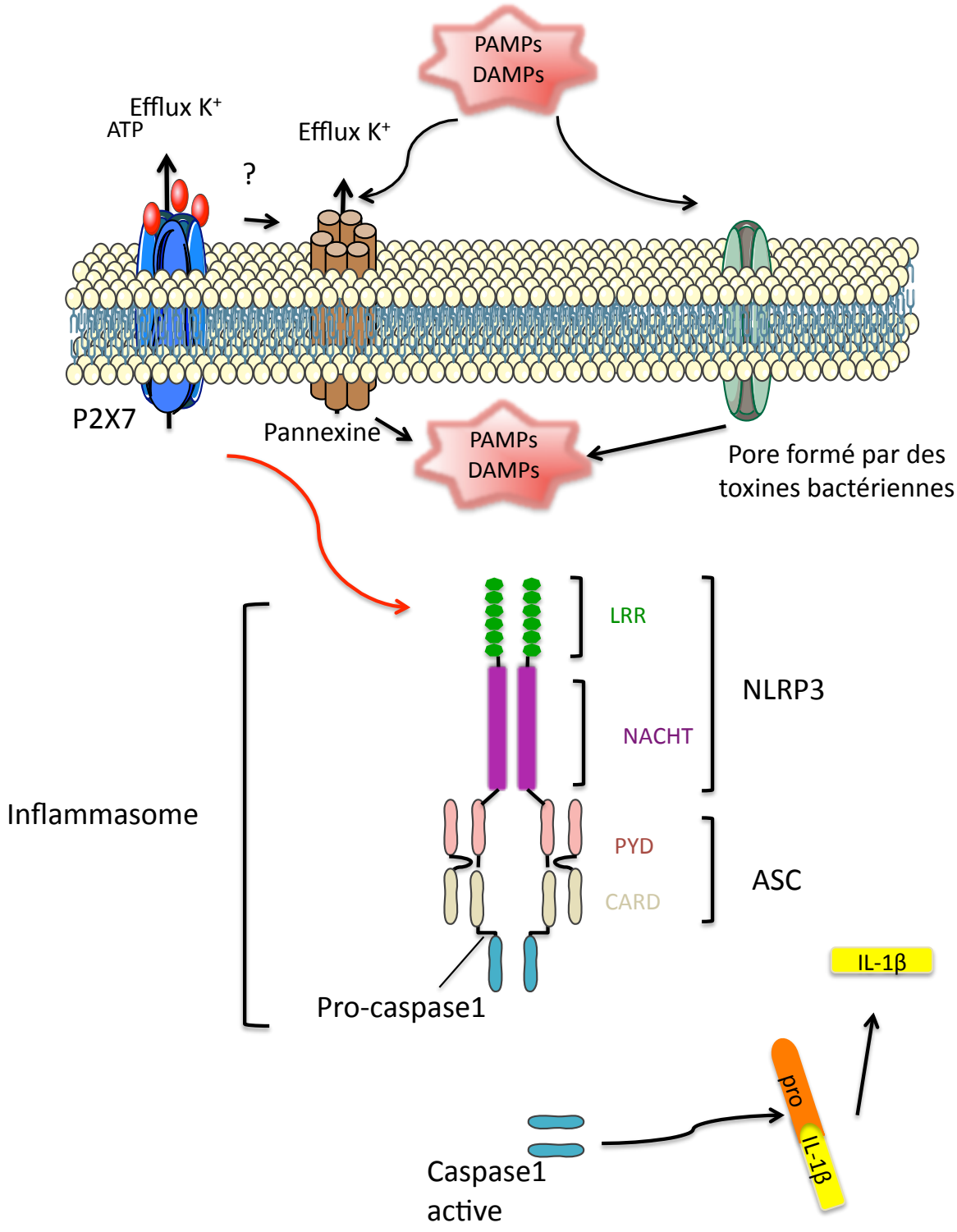


Figure 13 : Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3.

L'efflux de potassium via le récepteur P2X7 ou la pannexine active la protéine NLRP3. L'activation de NLRP3 induit un changement conformationel de la protéine qui conduit à son oligomérisation pour former l'inflammasome avec la molécule adaptatrice ASC et la pro-caspase 1. L'inflammasome entraîne la maturation de la caspase 1 qui va cliver la pro-IL-1β en IL-1β (modifiée de (92)).

1.3.6.5 P2X7 et la coupure des molécules de surface

L'activation du P2X7R est également associée à la coupure de nombreuses molécules pro-inflammatoires exprimées par les cellules immunitaires. Ces coupures protéolytiques mettent en jeu des sécrétases-α de type ADAM.

La fixation de l'ATP au P2X7R induit la coupure des molécules d'adhésion telles que CD62L et CD44 aboutissant à la migration des cellules vers les sites inflammatoires.

La molécule d'adhésion CD62L, exprimée par les neutrophiles et les lymphocytes, est impliquée dans la migration transendothéliale des leucocytes (cf partie ERM). Son clivage et sa libération dans le milieu extracellulaire permettent aux lymphocytes T de migrer vers les sites inflammatoires. De nombreuses études ont montré que la stimulation du P2X7R par l'ATP, le Bz-ATP ou le NAD+ est à l'origine de la coupure de CD62L et que celle-ci est dépendante d'ADAM17 (93). Le récepteur à l'acide hyaluronique CD44 est exprimé par les cellules hématopoïétiques et les cellules épithéliales. En 2012, une première étude a montré que la stimulation par l'ATP de la lignée de macrophage P388D1 induit la coupure de CD44. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ARN interférents ciblant le récepteur P2X7 ont prouvé que ce récepteur active la voie protéolytique responsable de cette coupure (94).

Par ailleurs, l'activation de P2X7 induit la libération rapide dans le surnageant des molécules suivantes :

- le récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23) *via* l'action protéolytique d'ADAM10 dans des cellules myélomateuses et dans des cultures primaires de lymphocytes B murins et humains (95 , 96).
- le précurseur de la protéine amyloïde

Ainsi, Delarasse et coll. ont mis en évidence que la stimulation du récepteur conduit à la coupure de l'APP et à la libération d'un fragment soluble sAPPα, connu pour ses propriétés neuroprotectrices. Cette voie de signalisation met en jeu les modules de MAPKinase ERK1/2 et JNK.

1.3.7 ROLE DU P2X7R DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX DE PATHOLOGIES

1.3.7.1 Rôle du P2X7R dans les maladies du SNC

1.3.7.1.1 Rôle du P2X7R dans la douleur inflammatoire chronique ou neuropathique

Le rôle du P2X7R dans la douleur a été étudié dans des modèles animaux de douleurs inflammatoire ou neuropathique. L'injection intra-plantaire d'adjuvant complet de Freund est un modèle reconnu de douleur inflammatoire alors que la ligation partielle du nerf sciatique est considérée comme un modèle pré-clinique d'hypersensibilité neuropathique. En comparant des souris P2X7R ko et P2X7R wt, Chessell et coll. ont observé que les souris P2X7R ko ne développaient pas d'hypersensibilité thermique et mécanique alors que les animaux wt présentaient une hyperalgie caractéristique. De plus, après injection d'adjuvant complet de Freund, alors que les souris wt présentaient une hypersensibilité inflammatoire significative, les souris P2X7R ko ne développaient pas d'hypersensibilité significative à aucun moment après l'injection intra-plantaire d'adjuvant. Cependant, en absence d'inflammation ou d'agression neuropathique, les réponses aux stimuli thermiques et mécaniques provoquaient des réponses comparables chez les animaux P2X7R ko ou wt. Ces résultats suggèrent donc que P2X7R est impliqué dans une forme de nociception dans laquelle il contrôle la production d'IL-1β mature (97). Ces observations ont été confirmées par des travaux faits chez le rat en utilisant un antagoniste spécifique du P2X7R (A-438079) (98). L'injection de A-438079 avait des propriétés anti-allodynique dans trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat. De plus, *in vitro*, A-438079 était capable de réduire de façon significative les décharges spontanées des 4 classes de neurones de la moëlle épinière chez des rats souffrant de douleurs neuropathiques et pas chez les contrôles.

1.3.7.1.2 Rôle du P2X7R dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer

La stimulation du P2X7R de la microglie entraîne une production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα et l'IL-1β (91, 99 , 100). Par ailleurs, les travaux de Parvathenani et coll. ont montré que l'activation du P2X7R provoque la production de superoxide par des cellules microgliales primaires (101). De plus, dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, ils ont observé que les cellules microgliales s'accumulent autour des plaques amyloïdes et surexpriment le P2X7R chez les souris transgéniques exprimant une forme mutée du précurseur de la protéine amyloïde humaine. L'ensemble de ces résultats a

conduit plusieurs groupes à tester le rôle potentiel de P2X7R dans la maladie d'Alzheimer. McLarnon et coll. ont montré que les cellules de la microglie de sujets atteints de maladie d'Alzheimer expriment très fortement le P2X7R alors que ce n'est pas le cas chez les sujets sains contrôles (102). De plus, le traitement de cellules microgliales humaines par le peptide Aβ1-42 provoque une augmentation très significative du P2X7R et de la réponse calcique de ces cellules après stimulation par le Bz-ATP. Enfin, l'injection du peptide Aβ1-42 dans l'hippocampe de rat entraîne un très fort accroissement du P2X7R dans les cellules microgliales. De plus, l'injection de l'antagoniste du P2X7R, le BBG a montré dans des rats injectés par le peptide amyloïde Aβ1-42 dans l'hippocampe qu'il y avait une très nette neuroprotection (103). En effet, chez ces rats, l'expression du P2X7R diminuait, la gliose et la perméabilité de la barrière hémato-méningée étaient atténuées et il y avait une nette diminution de la perte des neurones de l'hippocampe. L'ensemble de ces résultats suggère que le P2X7R des cellules microgliales favorise les réactions inflammatoires dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et que son inhibition atténue la pathologie.

1.3.7.2 Rôle du P2X7R dans les maladies auto-immunes

Les macrophages de souris P2X7R ko, stimulés par du LPS, sont incapables de libérer de l'IL-1β et de l'IL-18 matures après activation du P2X7R (104). De ce fait, le rôle potentiel du P2X7R dans les maladies auto-immunes systémiques ou spécifiques d'organes a été évalué dans des souris dont le gène codant P2X7R a été inactivé par recombinaison homologue au locus. Dans un modèle d'arthrite induite par un anticorps monoclonal anti-collagène, Labasi et coll. ont montré que les souris P2X7R ko développent une arthrite moins sévère que les animaux P2X7R +/+ (105). L'inflammation synoviale, les destructions du cartilage et la quantité de produits de dégradation du collagène étaient nettement réduits dans les animaux P2X7R ko, suggérant fortement que l'absence de P2X7R entraînait une diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, connue pour être impliquée dans la sévérité de l'arthrite. Chez l'homme, Portales-Cervantes et coll. ont analysé le rôle de P2X7R dans le lupus érythémateux disséminé (SLE) et dans la polyarthrite rhumatoïde (PAR) (106). Ils ont comparé l'expression et la fonction du P2X7R ainsi que les polymorphismes génétiques de ce récepteur (1513 A/C et 762T) chez des sujets sains et chez 101 patients atteints de SLE ou 112 malades présentant une PAR. Les deux mutations aboutissent à la formation de P2X7R non-fonctionnels. Portales-Cervantes et coll. n'ont trouvé aucune différence dans les

polymorphismes génétiques entre les patients et les contrôles. Par contre, Al-Shukaili et coll. ont déterminé que la présence de facteur rhumatoïde, et d'auto-anticorps anti-MCV était associée de façon significative avec le polymorphisme 1523 A/C chez les patients atteints de PAR (107). Chez ces derniers, Portales-Cervantes et coll. ont observé une augmentation significative de la libération d'IL-1β après stimulation par l'ATP de monocytes de patients atteints de PAR par rapport aux sujets contrôles. Ainsi, les observations faites chez les malades présentant une PAR sont compatibles avec celles faites dans le modèle d'arthrite murine même si les anomalies trouvées chez l'homme sont modérées. Le P2X7R semble donc impliqué dans la sévérité de l'arthrite alors que son rôle dans le lupus reste douteux. Cependant, l'implication du P2X7R dans le lupus repose essentiellement sur les études génétiques qui ont identifié 14 loci de susceptibilité au lupus parmi lesquels le locus SLEB4 (12q24) qui inclut le gène codant le P2X7R (108 , 109).

Comme l'incidence et la gravité de l'arthrite induite par les anticorps anti-collagène sont réduites chez les souris P2X7R ko, deux groupes de chercheurs ont étudié le rôle du P2X7R dans l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle animal de sclérose en plaques. Chen et Brosnan ont observé que les souris P2X7R ko développent une EAE plus sévère que les animaux contrôles (110). En effet, un accroissement significatif des lésions dans le système nerveux central (SNC) a été trouvé chez les souris P2X7Rko par rapport aux souris contrôles. Chen et Brosnan ont montré, dans des chimères de moëlle osseuse, que les cellules dérivées de la moëlle osseuse de souris P2X7R ko augmentaient la sévérité de la maladie chez les souris contrôles irradiées. De plus, le nombre de cellules apoptotiques dans le cerveau et la moëlle épinière était plus élevé chez les souris P2X7R+/+ que chez les animaux P2X7R ko. En conclusion, ces résultats suggèrent fortement que la diminution de l'apoptose des lymphocytes T dans le SNC des souris P2X7R ko joue un rôle majeur dans l'aggravation de l'EAE chez ces souris. On peut donc faire l'hypothèse que le P2X7R est stimulé par l'ATP libéré par les cellules détruites dans le cerveau. Ainsi, l'activation des P2X7R pourrait avoir un rôle régulateur au cours de la maladie en induisant une apoptose ou une cytolyse des cellules agressives dans le SNC. Cependant, des observations opposées à celles-ci ont été faites par Sharp et coll. qui ont observé dans une autre lignée de souris P2X7R ko, une réduction de l'incidence de l'EAE. La discordance entre ces deux études est due à l'utilisation de deux lignées différentes de souris P2X7R ko : la lignée PFIZER par rapport à celle de GlaxoSmithKline (GSK). En effet, il a été montré récemment que dans la lignée P2X7R ko GSK, les lymphocytes T expriment un P2X7R fonctionnel mais pas dans les macrophages et les cellules dendritiques (111). De plus, Nicke et coll. ont identifié une

nouvelle isoforme P2X7R (k) qui est exprimée dans la lignée P2X7R ko GSK mais pas dans la lignée PFIZER. Ce variant P2X7R (k) provient de l'utilisation d'un exon 1' et entraîne la formation d'un P2X7R présentant une sensibilité au ligand 8 fois supérieure à l'isoforme P2X7R (a) et qui transmet les signaux plus efficacement que l'isoforme (a). Ainsi, les résultats montrant que chez les souris P2X7R ko GSK, il y a une diminution de l'incidence de l'EAE, peuvent s'expliquer par la présence sur les lymphocytes T d'une isoforme fonctionnelle de P2X7R. De ce fait, les lymphocytes T agresseurs, porteurs d'un P2X7R (k) devraient être éliminés du SNC des souris développant l'EAE comme pour les souris contrôles P2X7R+/+.

Il est bien établi qu'en plus des lymphocytes, il existe d'autres populations cellulaires dans le SNC qui expriment le P2X7R. En particulier, les cellules microgliales, qui après stimulation du P2X7R, produisent des médiateurs inflammatoires parmi lesquels le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), un endocannabinoïde qui stimule les récepteurs CB1 (112). L'activation des ces récepteurs diminue la libération de glutamate et inhibe l'exocytotoxicité entraînant ainsi une diminution des destructions tissulaires. De plus, la stimulation des récepteurs CB2 exprimés par la microglie et les lymphocytes, diminue la production et la libération de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires. Witting et coll. ont montré que la quantité d'endocannabinoïdes dans le cerveau des souris P2X7R+/+ atteintes d'EAE et présentant des lésions axonales n'était pas augmentée de façon significative comme cela est observé dans d'autres neuropathies (112). Ces observations montrent que les destructions cellulaires survenant au cours de l'EAE n'entraînent pas de production d'endocannabinoïdes neuroprotecteurs comme dans diverses atteintes neuropathologiques. De plus, chez les animaux atteints d'EAE, la production d'endocannabinoïdes (2-AG) était significativement diminuée dans le cerveau des souris P2X7R ko comparées aux souris de génotype sauvage (wt) (112). La diminution des concentrations en 2-AG chez les souris P2X7R ko est en bonne corrélation avec les destructions tissulaires observées chez ces animaux comparés aux souris wt. De façon importante, Witting et coll. montrent que c'est probablement l'IFN produit par les lymphocytes T agresseurs qui entraîne une perte de fonctionnalité du P2X7R des cellules microgliales. En plus des cellules microgliales, les astrocytes expriment le P2X7R. Ces cellules sont capables de produire du 2-AG mais en quantité beaucoup plus basse que les cellules microgliales. Cependant, comme les astrocytes sont beaucoup plus nombreux que les cellules de la microglie, on peut faire l'hypothèse que la production de 2-AG par les astrocytes contribue à la neuroprotection. Ainsi, l'expression de P2X7R par les cellules microgliales et les astrocytes protège de l'EAE.

Les oligodendrocytes qui sont la cible de l'attaque autoimmune au cours de l'EAE, expriment des P2X7R fonctionnels qui, après stimulation, induisent la mort des oligodendrocytes *in vivo* et *in vitro* (113). De façon importante, le traitement des souris par des inhibiteurs pharmacologiques de P2X7R inhibe l'EAE chronique en entraînant une diminution de la démyélinisation. Les analyses des nerfs optiques des patients atteints de sclérose en plaques et des sujets contrôles en bonne santé, ont montré que l'ARN de P2X7R et la protéine P2X7R sont significativement augmentés chez les malades comparés aux contrôles. Ainsi, la stimulation du P2X7R pourrait accroître les lésions tissulaires dans le SNC des patients atteints de sclérose en plaques comme c'est le cas chez les souris atteintes d'EAE. L'ensemble de ces résultats suggère que le P2X7R sur les oligodendrocytes aggrave l'EAE alors que sa présence sur les lymphocytes T agressifs, les cellules microgliales et les astrocytes protègent de cette maladie autoimmune spécifique d'organe.

Dans quatre modèles de maladie inflammatoire de l'intestin, Gulbransen et coll. ont démontré que les neurones entériques qui expriment le P2X7R meurent du fait de la colite inflammatoire (114). L'inhibition du P2X7R par son inhibiteur pharmacologique l'ATP-oxydé protège les neurones de la mort mais n'inhibe pas les signes pathologiques associés à la colite tels que la perte de poids et les lésions tissulaires macroscopiques. De plus, la mort neuronale est dépendante des caspases et bloquée par l'inhibiteur de toutes les caspases : Z-VAD. Les auteurs suggèrent que la mort neuronale est dépendante de la pannexine-1 (Panx1) car elle est inhibée par le peptide inhibiteur ^{10} Panx et l'inhibiteur pharmacologique probenicid. Comme l'activation de la panx-1 peut être impliquée dans l'activation de l'inflammasome, les auteurs ont déterminé quelles molécules de l'inflammasome sont nécessaires à la mort neuronale. Grâce aux lignées de souris Asc ko et NLRP3 ko, ils ont pu établir que seule la protéine Asc est impliquée dans la mort neuronale. Leurs travaux ont permis d'établir que l'inhibition de la panx-1, des caspases et de la voie Asc est capable d'inhiber la mort neuronale mais n'améliore pas les signes de colite comme la perte de poids et les lésions tissulaires. L'ensemble de leurs résultats présente un intérêt thérapeutique car l'inhibition de la panx-1 peut protéger les neurones entériques et l'innervation des muscles coliques pendant la colite. Cependant, dans ces études, l'implication directe du P2X7R et/ou de la panx-1 repose uniquement sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Les auteurs auraient dû utiliser des animaux P2X7R ko et panx-1 ko pour solidement établir leurs conclusions.

Kawamura et coll. ont analysé le rôle des lymphocytes NKT dans l'hépatite autoimmune induite par la concanavaline-A (ConA) (115). Il est en effet établi que le traitement par la

ConA provoque une hépatite autoimmune dépendante des cellules NKT car leur élimination protège de la maladie. Par ailleurs, il a été démontré que le traitement par le NAD des lymphocytes T de souris entraîne une ADP-ribosylation des protéines de la membrane plasmique qui est catalysée par une enzyme membranaire appelée ADP-ribosyl transférase 2 (ART2) (52). Il est très important de noter que l'ADP-ribosylation du P2X7R provoque son activation caractérisée par un influx de Ca2+, l'ouverture d'un pore non sélectif et la mort des cellules. Parmi, les cellules mononuclées du foie, les lymphocytes T et NKT mais pas les cellules NK expriment l'ART2 et leur P2X7R de surface est ADP-ribosylée pourvu que du NAD soit ajouté à ces cellules (115). Les souris traitées par du NAD 2 heures avant l'administration de ConA sont protégées de l'hépatite car les cellules NKT du foie sont inactivées. Par contre, quand le NAD est injecté aux souris 3 heures après la ConA, la sévérité de l'hépatite est augmentée et 40% des animaux meurent (115). L'implication de P2X7R dans cette réponse est clairement établie car l'administration de NAD, après traitement des souris par la ConA, induit d'importantes lésions hépatiques alors chez les animaux P2X7R ko les destructions hépatiques sont significativement réduites. Ces expériences montrent que le P2X7R provoque des effets opposés au cours de l'hépatite autoimmune induite par la ConA. Des signaux inhibiteurs sont délivrés aux cellules NKT naïves diminuant les lésions hépatiques alors que des signaux activateurs sont donnés aux lymphocytes NKT activés par la ConA exacerbant l'hépatite autoimmune.

Le rôle du P2X7R dans le développement du diabète de type I chez les souris diabétiques non obèses (NOD) a été évalué par Yi-Guang Chen et coll. (116). Ils ont comparé l'incidence du diabète de type I chez des souris NOD des trois génotypes suivants : P2X7R wt, P2X7R +/- et P2X7R ko. Ils n'ont observé aucune différence entre les souris des trois génotypes quel que soit le sexe. Cependant, les mêmes auteurs avaient observé que le diabète de type I était accéléré dans les souris NOD déficiente en CD38, une ectoenzyme, qui hydrolyse le NAD et de ce fait diminue l'ADP-ribosylation de P2X7R sur les lymphocytes T. De ce fait, l'absence de CD38 entraîne une diminution de la mort cellulaire induite par l'ADP-ribosylation de P2X7R. Chez les souris NOD.CD38 ko, l'accélération du diabète de type I est attribuée à la mort cellulaire dépendante du NAD des lymphocytes T CD4+ NKT invariant et des lymphocytes T régulateurs FOXp3+ (116). Quand la déficience en P2X7R a été introduite dans le fond génétique des souris NOD.CD38 ko, l'absence de P2X7R chez les souris aboutit à une disparition de l'apparition accélérée du diabète. De façon très importante, Yi-Guang Chen et coll. ont démontré que les nombres de lymphocytes T CD4+ NKT invariant et de lymphocytes T régulateurs sont ramenés chez les souris NOD. CD38,P2X7R double ko aux

valeurs trouvées chez les souris NOD (116). Ces travaux démontrent que l'ADP-ribosylation des P2X7R entraîne la mort de sous-populations de lymphocytes T impliquées dans la régulation négative du diabète de type I dans les souris NOD.

2. LA SUPERFAMILLE 4.1

La superfamille 4.1 est constituée de nombreuses protéines qui sont caractérisées par la présence d'un domaine conservé FERM (Four.1 protein Ezrin Radixin Moesin) en position NH_2 terminale et d'un domaine SABD (Spectrin Actin Binding Domain) de liaison à l'actine ou à la spectrine en position C-terminale. La superfamille 4.1 peut être divisée en 5 familles : band 4.1 (protéine 4.1R, protéine 4.1G, protéine 4.1B et la protéine 4.1N), ERM (ezrine/radixine/moesine/merline/NBL6/NBL7), taline, PTPH1 (PTPH1/PTPMEG/NBL1-3), et NBL4 (NBL4/NBL5) (117) Ces protéines ont pour fonction principale d'établir un lien entre le réseau d'actine et les protéines membranaires.

2.1 EZRINE, RADIXINE ET MOESINE (ERM)

Chez l'Homme, l'ezrine (cytoviline ou p81), la radixine et la moesine sont issues de 3 gènes localisés sur les chromosomes 6, 11 et X. Ces protéines ont une masse moléculaire extrêmement proche (Ezrine : 69,2kDa ; Radixine : 68,5kDa ; Moesine : 67kDa) mais des profils d'expression différents. En effet, l'ezrine est principalement exprimée dans les cellules épithéliales et les microvillosités intestinales, la radixine dans le foie et la moesine dans les lymphocytes, les neutrophiles, les monocytes, les mastocytes et les plaquettes.

Suite à leurs activations, les ERM établissent un lien entre la région cytosolique de protéines de membrane telles que CD44, L1CAM et la F-actine.

2.1.1 STRUCTURE DES ERM

Les ERM possèdent entre elles une forte homologie de séquence avec 75% et 72% d'homologie entre l'ezrine/radixine et l'ezrine/moesine et 80% entre la moesine et la radixine. Les domaines FERM également appelés N-ERMAD (N-ERM Association Domain) sont très conservés et possèdent 85% d'homologie de séquence (Figure 14). En 2000, le complexe stable N/C-ERMAD de la moesine a été cristallisé, permettant de mieux comprendre la structure du domaine FERM (118).

Ce domaine globulaire est composé de trois modules nommés F1, F2 et F3 ayant une charge globale positive en surface. La structure de chaque lobe présente une forte homologie avec des protéines déjà répertoriées. En effet, le lobe F1 (résidus 5 à 82) a une structure comparable à l'ubiquitine, le sous domaine F2 (résidus 96 à 195) présente de forte similitude

avec l'acylCoA binding protein et le lobe F3 (résidus 204 à 296) a une structure proche du domaine phospho-tyrosine binding (PTB). *A contrario,* le domaine C-ERMAD, adopte une structure plus étendue qui, à l'état inactif des protéines, interagit avec les lobes F2 et F3 du domaine FERM (118).

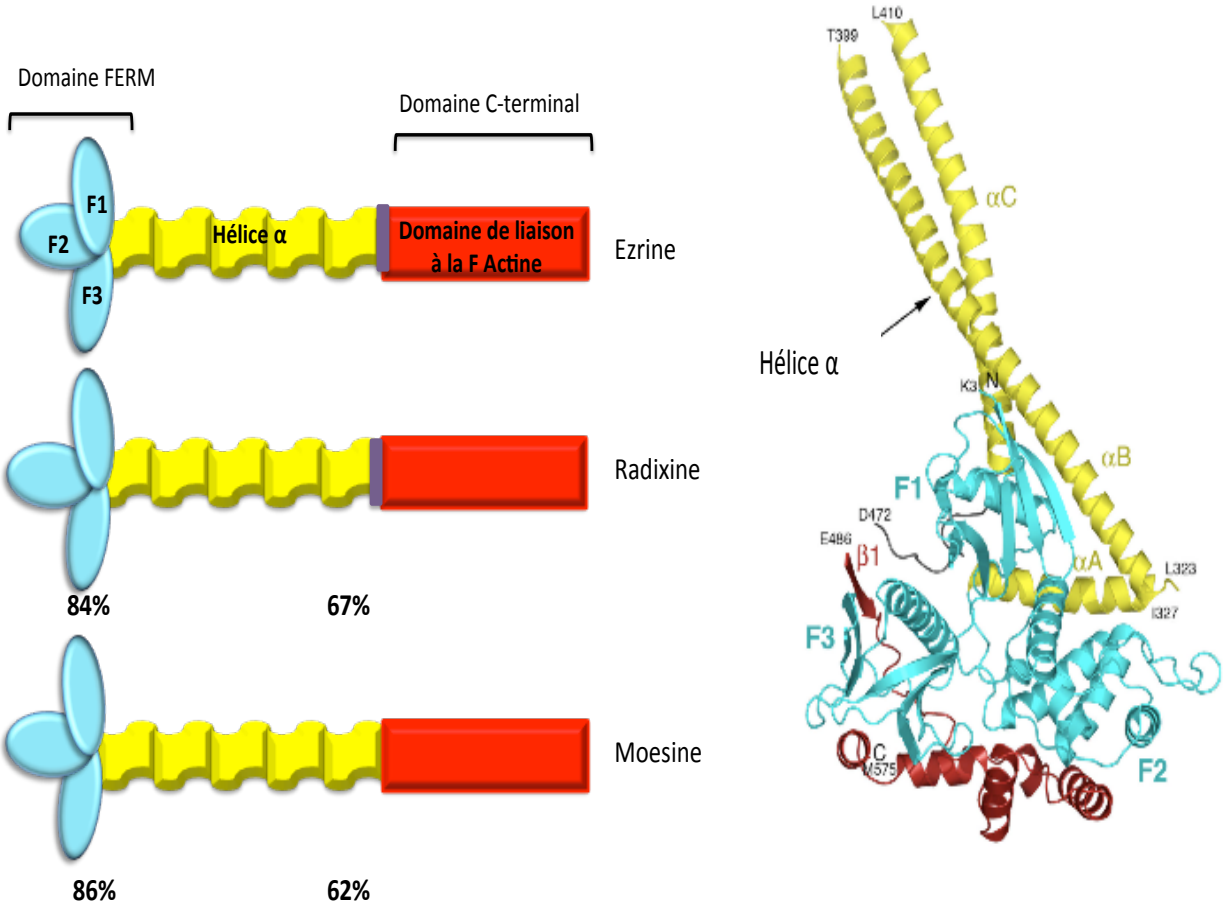


Figure 14 : Organisation de l'ezrine, la radixine et la moesine.
Les homologies de séquence sont exprimées en pourcentage. Le domaine NH_2 terminal (en cyan) correspond au domaine FERM aussi appelé N-ERMAD (N-terminal ERM association domain). Ce domaine est suivi d'une hélice alpha (en jaune) et d'une région riche en proline (en violet) pour l'ezrine et la radixine. La partie C-terminale (CTD) en rouge, nommé C-ERMAD (C-terminal ERM association domain) possède le site de fixation à la F-actine. Modifiée de (119, 120)

En 2007, la structure complète de la moesine endogène de cellules ovariennes de *Spodoptera frugiperda* a été cristallisée sous sa forme monomérique et inactive (120). Le domaine central est constitué de trois hélices α (αA, αB et αC), jouant un rôle crucial dans le masquage du domaine FERM (Figure 14). Au vu des homologies de séquence entre les ERM des

différentes espèces, il est fort probable que cette structure soit conservée.

2.1.2 REGULATION DE L'ACTIVATION DES ERM

A l'état inactif, les ERM ont une conformation repliée dans le cytosol. L'activation des ERM résulte d'un changement conformationnel aboutissant à l'interaction du domaine FERM avec la région sous membranaire des protéines de surface et la liaison de la région C-ERMAD aux éléments du cytosquelette.

2.1.2.1 Interaction intra et intermoléculaires

A l'état « dormant », les domaines NH_2 et COOH terminaux interagissent entre eux. En effet, les résidus NH_2 terminaux 1 à 297 de l'ezrine et la moesine peuvent s'associer, avec une forte affinité, aux 107 résidus COOH terminaux des différents membres de cette famille.

L'association intramoléculaire des domaines N- et C-ERMAD met en jeu des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques. De nombreuses charges positives, localisées dans la région C-terminale lient les lobes F2 et F3 chargés négativement rendant physiquement inaccessible le site de liaison à l'actine (118).

Ainsi, il existe des interactions homophiliques et hétérophiliques entre les ERM. Au vu de cette fonction, ces domaines ont été appelés N- et C-ERMAD pour N-, C-terminal ERM Association Domain (121).

In vitro, l'activation par une PKCθ de l'ezrine et la moesine en présence de lipides (122) permet la dissociation des domaines N- et C-ERMAD, validant l'hypothèse du changement de conformation comme modèle d'activation (123).

2.1.2.2 Activation des ERM

Cette activation requiert deux étapes essentielles (Figure 15) :

1. Le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PI(4,5)P2) se fixe aux ERM et rend accessible un résidu phosphorylable en position C-terminale
2. une kinase phosphoryle généralement un résidu thréonine conservé stabilisant l'état déplié (actif) de la molécule.

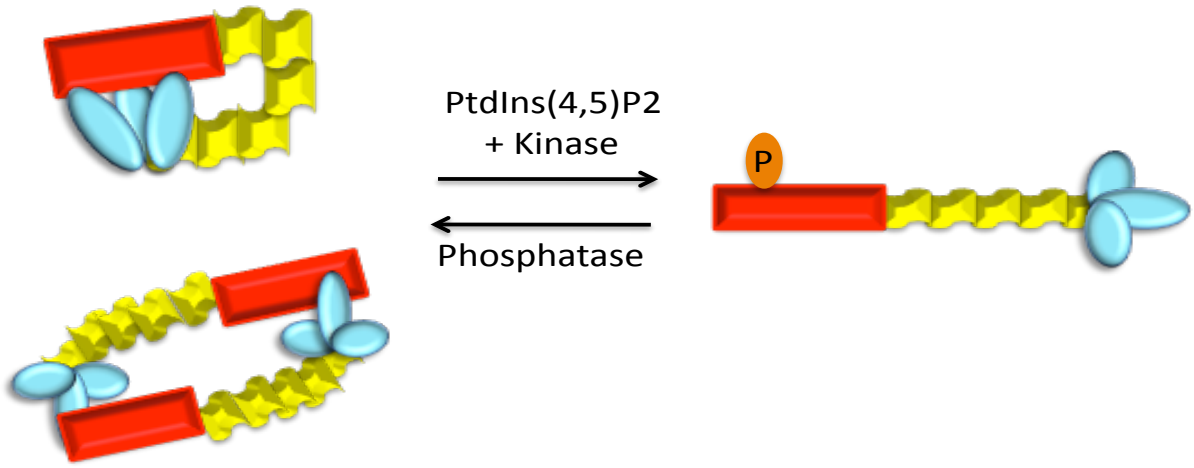


Figure 15 : Mécanisme d'activation/inactivation des ERM.
Après la liaison du PI(4,5)P2 aux ERM, des kinases spécifiques vont phosphoryler les thréonines conservées des ERM (T567 de l'ezrine ; T564 de la radixine et T558 de la moesine). Ces modifications vont aboutir au dépliement de la protéine et rendre accessible le domaine de fixation à l'actine (en rouge) et le domaine FERM (en cyan). A gauche, suite à l'action de phosphatases, le domaine FERM et le domaine de liaison à l'actine vont interagir et former des monomères ou des dimères inactifs. Modifiée de (124).

2.1.2.2.1 Activation des ERM par les phosphoinositides

De nombreuses études impliquent les phosphoinositides dans l'activation des ERM. En effet, l'association des ERM aux molécules d'adhésion ICAM-1 et -2 (125) et au récepteur à l'acide hyaluronique CD44 est augmentée en présence de phospholipides (126). A faible concentration ionique (40mM KCl), la moesine lie avec une forte affinité la région cytosolique chargée positivement de CD44 (Kd = 9,3 +/-1,6nM). Cependant, à des concentrations physiologiques en sel (150mM KCl), cette interaction reste trop faible pour être quantifiable. Les auteurs ont observé qu'en présence de phosphatidylinositol-4-monophosphate ou de PI(4,5)P2, la moesine interagit avec une forte affinité avec CD44 (Kd = 9,3+/- 4,8nM), dans des conditions physiologiques (127). En 2012, Ben Aissa et coll. ont proposé un mécanisme séquentiel d'activation de la moesine dû à la fixation du PI(4,5)P2 (128). A l'état inactif, une molécule de PI(4,5)P2 s'associe transitoirement aux résidus K63 et K278 d'un site nommé «PATCH». Cette première étape favorise la libération d'une boucle auto-inhibitrice (FLAP). Ce changement conformationnel rend accessible à la molécule de PI(4,5)P2, un second site de fixation nommé « POCKET ». L'interaction stable du PI(4,5)P2 avec les résidus K253/254 et K262/263 de la moesine est responsable de la première étape d'activation des ERM (128).

Cependant, les phosphoinositides ne suffisent pas à activer les ERM. En effet, la phosphorylation de la thréonine 558 de la moesine est indispensable à sa fixation à la F-actine (129).

2.1.2.2.2 Activation des ERM par phosphorylation

Le changement de conformation et l'activation des ERM résultent de la fixation du PI(4,5)P2 et de la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé en C-terminal des ERM: T567 Ezrine, T564 Radixine, T558 Moesine. La phosphorylation de ces protéines est attribuée à de nombreuses kinases telles que la lymphocyte-orientated kinase (LOK) (130 , 131), différentes PKC (132 , 133) ou encore la Rho Associated Kinase (ROCK) (123 , 134 , 135 , 136) et semble dépendre du type cellulaire suggérant que les ERM agissent dans différentes voies de signalisation (Tableau 3).

La principale kinase décrite dans la phosphorylation des ERM est la ROCK (123 , 134 , 135 , 136). Cependant, à l'heure actuelle son rôle reste controversé. En effet, d'autres études suggèrent que la ROCK a une action uniquement *in vitro*. Les résultats obtenus *in vivo* démontrent que la phosphorylation des ERM est dépendante de Rho et du PIP2 produit par l'action de PI4P5K (137).

Chez l'Homme, seule l'ezrine peut être phosphorylée sur trois tyrosines (résidus absents de la radixine et de la moesine) : Y145, Y353 et Y477. La stimulation des cellules épithéliales de rein LLC-PK1 et des cellules A431 par l'Epidermal Growth Factor (EGF) ou par l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) conduit à la phosphorylation de l'ezrine sur les tyrosines Y145 et Y353 par la Src kinase (138 , 139).

2.1.2.3 Inactivation des ERM

L'inactivation des ERM est un processus encore très peu étudié qui fait néanmoins appel à des phosphatases et à des calpaïnes responsables de leurs dégradations.

Il a été démontré que de multiples phosphatases (la myosine phosphatase (PP1β-MYPT1), les tyrosines phosphatases PP2A (138), PP2C et PP1α (140)) ont pour substrat les ERM.

D'autre part, l'activité de ERM peut être régulée par leur dégradation. Dans des cellules C2C12, la calpaïne 1 dégrade l'ezrine aboutissant à une désorganisation du cytosquelette lors de la myogenèse (141), à l'extravasation et la migration des lymphocytes dans le foyer inflammatoire (142), ainsi qu'à la mort par apoptose des polynucléaires neutrophiles (143).

Cependant, la phosphorylation de l'ezrine sur la sérine 66 par une PKA empêche l'action des calpaïnes et *in fine* sa dégradation (144)

Site de phosphorylation	Kinase	ERM	Stimulus	Lignée cellulaire	Fonction	Référence
Thr 567 Ezrine Thr 564 Radixine Thr 558 Moesine	PKC	ERM	glutamate	cellule de l'hippocampe	formation du bouton synaptique	(133)
	PKC θ	M		cellule T Jurkat		(122)
	PKCβ	ERM	Amphétamine	PC12	Plasticité synaptique	(132)
	PKCι	E	ND	cellules épithéliales de l'intestin	différenciation	(145)
	Rho/ROCK	ERM	Benzoyl ATP	Neuro2a	clivage de l'APP	(146)
		E	œstrogène	T 47 D cancer du sein	migration et invasion	(147)
		ERM	LPA	SKOV3Cancer ovarien	migration et invasion cellulaire	(134)
		E	cisplatine	HT 29 cancer du colôn	Apoptose	(148)
		EM	activation du récepteur Fas	Jurkat	Apoptose	(135)
		ERM	Netrin	neurones coticaux	croissance axonale	(136)
		E	TNF	cellules endothéliales	inhibition de la prolifération	(149)
		E	Net et dbl surexpression	NIH3T3	Transformation maligne	(150)
	LOK	ERM	LOK surexpression	lymphocyte	diminution de la migration et polarité	(130)
	p38 MAPK	ERM	TNF	Synoviocytes	Prolifération	(151)
Tyrosine 145, 353 et/ou 477	Src	E	EGF	A 431	Prolifération	(138)
		E	ICAM1	cellules endothéliales	ND	(152)
	Lck	E	ND	Jurkat	Activation des cellules T	(153)
Ser 66	PKA	E	Histamine	cellules pariétales gastrique	sécrétion acide	(154)

Tableau 3: Kinases impliquées dans l'activation des ERM. Modifiée de (124).

2.1.3 FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ERM

Les ERM établissent un lien entre la région cytosolique de protéines de surface et le réseau d'actine du cytosquelette. La localisation sous membranaire des ERM activées n'est donc pas surprenante. Les ERM peuvent lier directement des molécules d'adhésions (CD44 ; ICAM), ou des enzymes (PI3K ; ADAM8). Cependant, l'interaction ERM/molécules de surface peut être indirecte. En effet, la liaison du récepteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (155) et de l'échangeur Na+/H+ aux ERM s'effectue via les protéines adaptatrices NHERF/EBP50. La région C-terminale de ces protéines interagit avec les ERM tandis que leurs domaines PDZ s'associent aux domaines cytosolique des molécules de surface. A ce jour, aucun site consensus de fixation des ERM n'a été défini. Toutefois, il est clair que les ERM fixent des régions riches en résidus basiques du domaine cytosolique des protéines (Tableau 4) (156).

De nombreuses études ont montré un enrichissement des ERM dans les microvillosités des cellules épithéliales, les lamellipodes et dans le phénomène de bourgeonnement vésiculaire (blebbing). Les ERM ont un rôle clé dans l'organisation du réseau du cytosquelette, dans le maintien de structure spécifique, l'adhésion et la migration cellulaire, la localisation sub-cellulaire et dans le trafic des protéines ainsi que dans la transduction des signaux (Figure 16).

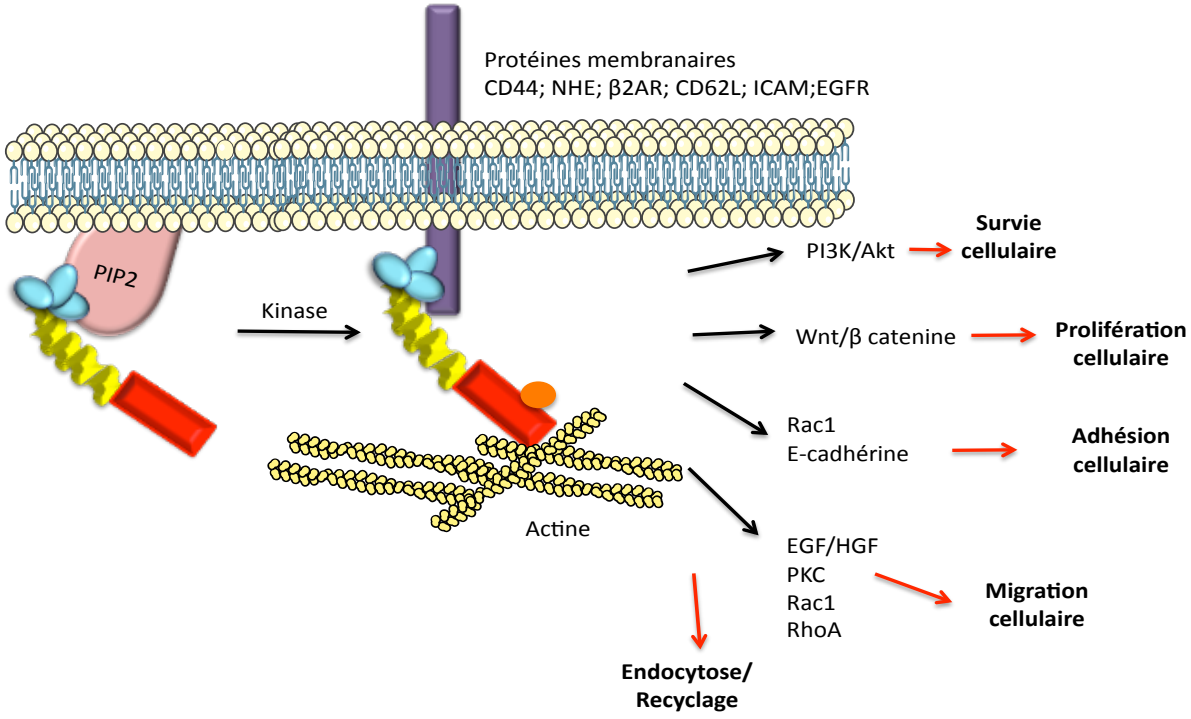


Figure 16 : Voies de signalisation et fonctions cellulaires impliquant les ERM. Modifiée de (124)

Interactants	ERM	Techniques	Site de fixation	Références
Protéines Adaptatrices				
NHERF1/EBP50	E R M	Cristallographie	**M**D**W**xxxxx(L/I)**F**xx(L/F)	(157 , 158 , 159)
NHERF2/E3KARP	E R M	Cristallographie	**M**D**W**xxxxx(L/I)**F**xx(L/F)	(159, 160)
Protéines Cytosoliques				
NHE 3	E	Co-IP/Pull Down	K516, R520, R527	(161)
Tyrosine Kinase FES	E	Pull Down	Domaine SH2	(162)
Calpaïne 6	E	Pull Down	ND	(160)
PLCB3 1	E	Pull Down	ND	(160)
p85	E	Pull Down	Domaine SH2	(163)
Src kinase	E	Pull Down	Domaine SH2	(138)
Protéines Transmembranaires				
CD43	E M	Pull Down	**RQKRRTGALTLSGGGKRN**	(156 , 164)
CD44	E R M	Pull Down	Q**KKKLVIN**G	(126 , 156)
CD62L	E M	Co-IP/ BIAcore	(R357 ; K362) R**R**LKKG**K**KSKR	(165 , 166)
PSGL	M	Co-IP	ND	(167 , 168)
ADAM8	M	Co-IP	ND	(168)
L1CAM	E M	Double hybride	RSLE	(169)
ICAM 2	E	Pull down	HWH**RRR**TGTY	(156)
ICAM 3	M	Pull Down	REHQRSGSYHVREESTYLPLTS	(170)

Tableau 4: Molécules interagissant avec les ERM :
NHERF1 : Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor 1 /EBP50 : ERM-binding phosphoprotein 50 ; NHERF2 : Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor 2/E3KARP : NHE3 kinase A regulatory protein ; PLCB3 : 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3 ; P85 : Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha ; CD44 : Receptor for hyaluronic acid ; CD62L : L-selectin ; ICAM 2 : intercellular adhesion molécule 2 ; ICAM 3 : intercellular adhesion molécule 3 . ND : Non déterminé.

2.1.3.1 Phénotypes des souris invalidées pour les gènes codant les ERM

Les ERM ont une expression spécifique de tissu. Par exemple, dans les cellules épithéliales intestinales, seules l'ezrine et la moesine sont exprimées tandis que les hépatocytes n'expriment que la moesine et la radixine. Cette spécificité d'expression suggère que ces trois protéines ont des fonctions différentes.

Les souris invalidées pour le gène de l'ezrine meurent peu de temps après leur naissance. Au niveau intestinal, elles présentent une altération des jonctions cellule-cellule ainsi qu'un défaut dans la formation des villosités des épithéliums stratifiés (171). De plus, l'utilisation de ces souris KO a permis de mettre en évidence le rôle de l'ezrine dans la formation et l'expansion des membranes apicales des canalicules dans des cellules pariétales gastriques. L'absence d'expression de l'ezrine dans ces cellules conduit à une achlorydrie (172) probablement due à un défaut de régulation du transporteur H+/K+ ATPase (154).

Les souris invalidées pour le gène de la radixine sont viables et fertiles mais développent différentes pathologies à la naissance. Quatre semaines après la naissance, elles présentent une augmentation de la bilirubine conjuguée dans le sérum. A huit semaines de vie, les souris présentent des lésions hépatiques et une altération morphologique des cellules biliaires polarisées. En effet, l'absence de la radixine empêche l'expression de la protéine MRP2 à la surface des cellules, une protéine essentielle dans la mise en place de la polarité cellulaire (173).

D'autre part, un défaut d'expression de la radixine affecte l'audition. Les cellules ciliées cochléaires sont essentielles à la transduction des stimuli acoustiques en impulsions électriques tandis que les cellules ciliées vestibulaires détectent l'accélération de ces impulsions. Avant P14, l'ezrine est surexprimée et pallie ainsi à l'absence de la radixine dans les cellules ciliées cochléaires et vestibulaires. Cependant, 14 jours après la naissance, les souris contrôles et invalidées pour la radixine présentent une diminution d'expression de l'ezrine dans les cellules cochléaires. Ceci entraîne chez les souris invalidées une surdité (174). Ces résultats tout à fait remarquables démontrent le rôle primordial de la radixine dans le fonctionnement du système auditif. Ils indiquent que les phénomènes de compensations entre les ERM dépendent du type cellulaire.

Doi et coll. ont généré des souris invalidées pour la moesine. Ces souris sont fertiles et présentent un développement normal. L'étude des fonctions physiologiques des mastocytes a montré que l'absence de la moesine est compensée par l'ezrine et la radixine sans que celles-ci soient surexprimées (175).

2.1.3.2 Rôle dans la coupure protéolytique de molécules de surface

Suite à leur activation, les ERM interagissent avec de nombreuses glycoprotéines membranaires de type I susceptibles d'être clivées par des métalloprotéases. Différentes équipes ont mis en évidence l'implication des ERM dans la coupure protéolytique de certaines molécules de surface.

La L-sélectine (CD62L) est une molécule d'adhésion impliquée dans la diapédèse ou la migration des lymphocytes. Par des techniques biochimiques, Ivetic et coll. ont observé que l'ezrine interagit avec CD62L de façon constitutive tandis que la liaison entre la moesine et CD62L est induite par une stimulation au PMA. La molécule CD62L est constituée d'une courte région cytosolique à caractère basique composée de 17 acides aminés. Par mutagénèse dirigée, les auteurs ont prouvés que la moesine lie l'arginine 357 et la lysine 362 de CD62L (Figure 19). L'inhibition de l'interaction moesine/CD62L affecte la localisation du complexe et diminue de 50% la coupure protéolytique de CD62L par la protéase ADAM17, après stimulation par le PMA. Ces résultats suggèrent que la liaison des ERM à CD62L favorise le recrutement de la protéase ADAM17 (165 , 166, 176).

Plus récemment, une étude a mis en lumière la fonction des ERM dans la coupure protéolytique de molécule de surface en recrutant le substrat PSGL1 et sa protéase ADAM8. Ces travaux ont montré par co-immunoprécipation que les ERM lient ADAM8 et PSGL1. L'inhibition des ERM par ARN interférents diminue l'interaction entre l'enzyme et son substrat et *in fine* la coupure de PSGL1. Les ERM semblent indispensables à la coupure protéolytique de la PSGL1 par ADAM8 en rapprochant l'enzyme de son substrat (168).

2.1.3.3 Rôle dans le trafic des récepteurs de surface

La régulation de différentes voies de signalisation passe par une expression transitoire de récepteurs à la surface des cellules. Cette modulation fait appel à différents processus finement régulés tels que l'endocytose et le recyclage à la membrane de ces protéines.

Différents travaux ont démontré que les ERM sont des acteurs clé dans le transport/recyclage en liant les récepteurs de surface (177). L'activation de l'ezrine conditionne le recyclage à la membrane des récepteurs α_{1b} adrénergique (178) et NHE3 (échangeur Na^+/H^+) (161). En effet, dans l'épithélium intestinal, l'activité du co-transporteur Na^+/glucose SGLT1 conduit à la phosphorylation de l'ezrine sur la thréonine 567 responsable de l'expression accrue au pôle apical de l'échangeur NHE3 et de son activation. Cette voie de signalisation dépendante de

l'activité des MAP-Kinase p38 et de Akt2 entraîne l'association directe de l'ezrine à NHE3 (161, 179 , 180). Cet effet diffère de l'association indirecte de NHE3 à l'ezrine *via* l'adaptateur NHERF qui est connu pour limiter la diffusion de NHE3 à la membrane. Ces études suggèrent que le type d'association (directe ou indirecte) de l'ezrine à NHE3 aboutit à une régulation différente de l'échangeur Na+/H+. Contrairement à NHE3, l'interaction entre le CFTR et EBP50/NHERF semble essentielle à la localisation apicale du récepteur mais également à son expression membranaire en favorisant son recyclage (155 , 181). Par ailleurs, la translocation et l'insertion de la pompe H+/K+ ATPase consécutive à la phosphorylation de la sérine 66 de l'ezrine par la PKA conditionne le remodelage du pôle apical des cellules pariétales gastriques et la sécrétion d'acide (154).

Le recyclage et l'endocytose du récepteur β2 adrénergique sont régulés par les ERM. En effet, l'ezrine est capable de lier indirectement ce récepteur *via* l'adaptateur NHERF1. L'analyse du trafic de ce récepteur a montré une co-localisation de l'ezrine et du récepteur dans des vésicules d'endocytose. L'utilisation du dominant négatif N-ezrine diminue considérablement l'endocytose du récepteur (182).

2.1.3.4 Rôle des ERM dans l'adhésion, la migration et la survie cellulaire

L'activation des ERM après stimulation de nombreux récepteurs conditionne la migration cellulaire. En réponse à une stimulation à l'HGF, l'ezrine favorise la motilité cellulaire en provoquant la dissociation des contacts cellule-cellule et la formation de protrusions membranaires (139 , 162). D'un point de vue moléculaire, la stimulation par le PMA active la PKCα responsable de la phosphorylation de l'ezrine. Cela promeut l'interaction de l'ezrine avec le récepteur CD44 et favorise la motilité cellulaire (183 , 184). Par ailleurs, dans les neurones, l'inactivation de la radixine au niveau du cône de croissance entraîne une rétraction des lamellipodes. Cette étude met en lumière l'importance de la radixine dans la motilité du cône de croissance (185).

Les ERM sont également associées au phénomène de bourgeonnement vésiculaire (blebbing). La formation des bourgeons cellulaires est due à un réarrangement du cytosquelette et à un enrichissement d'actine à la face inférieure de la membrane cellulaire. Ces bourgeons cellulaires sont impliqués dans l'apoptose, la cytokinèse et la migration cellulaire. Il est admis que les ERM jouent un rôle dans leurs formations et que l'activité Rho-Kinase (connue pour phosphoryler les ERM) est augmentée dans ces structures (186 , 187).

En 1999, Gautreau et coll. ont attribué pour la première fois à l'ezrine un rôle dans la survie de cellules épithéliales. Les cellules exprimant le mutant de l'ezrine Y353F entrent en apoptose. La phosphorylation de cette tyrosine entraîne son recrutement à la membrane plasmique et son interaction avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K. En effet, la tyrosine 353 lie le domaine SH2 de la PI3K et conduit à l'activation de la voie de survie PI3K/Akt (163).

D'un point de vue pathologique, de nombreuses études attribuent aux ERM un rôle dans l'invasion tumorale. Dans différents carcinomes humains (ostéosarcome, cancer du sein, de la prostate et plus récemment astrocytome), l'expression des ERM est fortement augmentée. Ces travaux ont également montré que la localisation des ERM est altérée dans les cellules cancéreuses. Ces changements sont corrélés avec un fort pouvoir invasif cellulaire (188). Par ailleurs, Gavert et coll. ont montré que l'association de l'ezrine à la protéine d'adhésion L1CAM accroît le pouvoir métastatique dans le cancer colorectal (189). Les mécanismes moléculaires n'ont pas encore été identifiés.

2.1.3.5 Rôle dans la synapse immunologique

La reconnaissance de l'antigène par le récepteur T pour l'antigène (TCR) entraîne dans le lymphocyte T un réarrangement du cytosquelette d'actine et une redistribution moléculaire très organisée. Ces modifications morphologiques et moléculaires ont lieu au niveau de la synapse immune, point de contact entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène (CPA).

Différentes équipes ont pu mettre en évidence l'intervention des ERM dans la réorganisation spatiale des protéines membranaires (pour revue (190)). La sur-expression d'une forme non fonctionnelle de l'ezrine inhibe l'accumulation du TCR ainsi que l'activation du facteur de transcription NF-AT responsable de la production de l'IL-2 nécessaire à la prolifération des cellules T (191 , 192).

L'ezrine et la moesine sont également impliquées dans l'exclusion de leur partenaire d'interaction CD43 (régulateur négatif de l'activation des cellules T) hors de la synapse immune. Suite à l'activation du TCR, l'interaction entre CD43 et la moesine serait rompue, permettant à la protéine CD43 de diffuser hors de la synapse immune. Cette migration permettrait à CD43 de se réassocier à la moesine extrasynaptique maintenant sa localisation hors de la synapse (193 , 194).

2.2 LA MERLINE :

La merline est un membre de la famille 4.1 et présente de forte similitude avec les ERM. Elle participe également au remodelage du cytosquelette en liant notamment la fodrine et participe à la transduction de signaux en interagissant avec le domaine cytosolique de protéines de surface.

2.2.1 GENE, EXPRESSION ET STRUCTURE DE LA MERLINE

Le gène *NF2* est constitué de 17 exons et code une protéine : la merline (ou NF2). L'analyse de sa séquence protéique a révélé certaines homologies avec les ERM à qui elle doit son nom (moesine, ezrine, radixine-like protein) (195, 196). Il existe deux isoformes issues d'un épissage alternatif. L'isoforme 1 est composée des exons 1-15 et 17 et code pour une protéine de 595 acides aminés. L'isoforme 2 est constituée des exons 1-16 codant une protéine de 590 acides aminés (197). Il semblerait que seule l'isoforme 2 exerce une fonction de suppresseur de tumeurs.

La merline est principalement exprimée dans le cerveau mais aussi dans les poumons, l'intestin, la rate, et le rein. Elle présente une structure similaire aux ERM et possède en NH2 terminal un domaine FERM présentant une forte homologie avec celui de l'ezrine (63%). Cependant, contrairement aux ERM, aucun domaine de fixation à l'actine ou à la spectrine n'a pu être caractérisé à son extrémité C-terminale. Néanmoins, la merline possède une séquence de 18 acides aminés en position NH2 terminale (inexistante dans les ERM) capable de lier l'actine et la spectrine (198).

2.2.2 MECANISMES D'ACTIVATION ET D'INACTIVATION DE LA MERLINE

La myosine phosphatase MYPT-1-PP1δ est responsable de la déphosphorylation activatrice de la merline. Des expériences de GST pull-down ont démontré que les résidus 312 à 341 de la merline interagissent avec la sous-unité régulatrice MYPT-1 de la phosphatase favorisant la déphosphorylation de la sérine 518 et l'activation de la merline (199).

2.2.3 FONCTIONS DE LA MERLINE

Les souris $NF2^{-/-}$ ne sont pas viables et décèdent précocement durant l'embryogenèse démontrant le rôle crucial de la merline au cours du développement. Les souris $NF2^{+/-}$ sont viables mais développent rapidement de nombreuses tumeurs suggérant que la merline possède une fonction de suppresseur de tumeur.

Comme les ERM, la merline interagit avec de nombreuses protéines. En liant les protéines transmembranaires, la merline régule leurs localisations et leurs fonctions. Par exemple, la liaison de CD44 à l'acide hyaluronique active de la merline. Une fois activée la merline va interagir avec CD44 et inhiber la croissance et la prolifération cellulaire (200).
Par ailleurs, la merline interagit avec :

- l'ezrine régulant ainsi son activité (201)
- la sous-unité de la fodrine (202) et la synthenine1 (203) ce qui lui fait jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette et le transport vésiculaire
- VprBP et DDB1 qui appartiennent à un complexe E3 ligase. De ce fait, ces protéines régulent la dégradation de la merline par le protéasome (204)

La merline est surtout étudiée pour son implication dans la neurofibromatose de type 2 qui est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Une mutation sur le gène *NF2* est à l'origine de cette maladie qui se caractérise par l'apparition de tumeurs principalement dans le système nerveux. Les tumeurs associées à la neurofibromatose de type 2 sont des schwannomes vestibulaires, des méningiomes (tumeur bénigne des méninges) et des épendymomes (tumeur bénigne localisée au sein d'une tunique recouvrant la moelle épinière). Plus rarement, cette mutation est associée au cancer colorectal, au cancer de la prostate, au mélanome et au cancer de la thyroïde (pour revue (205)).

3. LES METALLOPROTEASES

Les métalloprotéases sont des enzymes issues de la superfamille des Metzincines. Cette sous-famille peut être divisées en 4 classes de métalloprotéases : les métalloprotéases matricielles (MMP), les métalloprotéases matricielles transmembranaires (MT MMP), les métalloprotéases possédant un domaine désintégrine (ADAM) et les métalloprotéases pourvues d'un domaine désintégrine et thrombospondine (ADAM TS). Ces enzymes se caractérisent par la présence d'une région qui lie le zinc ou le cuivre nécessaire à la catalyse. Elles ont pour fonction de couper des molécules et sont principalement inhibées par les Tissue Inhibitor of Metalloproteases (TIMP) en les liant avec une stœchiométrie de 1 :1 mais aussi par l'α2-macroglobuline pour les MMPs.

3.1 LES METALLOPROTEASES MATRICIELLES (MMP)

Les métalloprotéases matricielles (ou matrixines) comptent 23 membres chez l'Homme. Celles-ci sont constituées de 4 domaines :

- un peptide signal utile à l'adressage de la protéine,
- un pro-domaine clivable et dont le groupement thiol de la cystéine de la séquence PRCGXPD interagit avec le zinc du site catalytique maintenant la protéase sous sa forme zymogène inactive.
- un site catalytique
- un domaine hémopexine capable d'interagir avec un hème (sauf pour MMP 7, 23 et 26)

Dans l'appareil de Golgi, les MMP subissent une première étape de maturation par coupure du pro-domaine par des convertases telles que des furines (206). Ces MMP sont sécrétées et sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

3.2 LES METALLOPROTEASES MATRICIELLES TRANSMEMBRANAIRES (MT-MMP) :

A l'heure actuelle, six MT MMP ont été décrites. Celles-ci possèdent une structure semblable aux MMP. Ils existent deux MT MMP qui sont attachées à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (MT4-MMP et MT6-MMP), les quatre autres

possèdent une région transmembranaire. Les principales fonctions des MT MMP sont de dégrader la matrice extracellulaire et d'activer certaines MMP (207).

3.3 LES METALLOPROTEASES ADAMS:

(Pour Revue complète voir (208))

Trente trois ADAMs (A desintegrin And Metalloproteinases) ont été recensées. Chez l'Homme, douze ont un site catalytique fonctionnel. Les ADAMs sont des protéines transmembranaires de type I. Leur partie N-terminale est similaire aux MMP. Le domaine catalytique des ADAMs contient le motif HExGHxxGxxHD dont les histidines servent à l'interaction avec le Zn^{2+}. Le domaine catalytique des ADAMs est suivi : d'un domaine désintegrine qui contient une séquence consensus AVN**ECD**ITEY capable de lier les intégrines et d'une région riche en cystéine. Dans un premier temps, le domaine désintégrine a été décrit comme interagissant avec les intégrines. Cependant, en 2006 la cristallographie de la protéase VSP1 (homologue des ADAMs) a révélé que la conformation de la région riche en cystéine rend le domaine désintégrine inaccessible à toute interaction avec d'autres protéines (208).

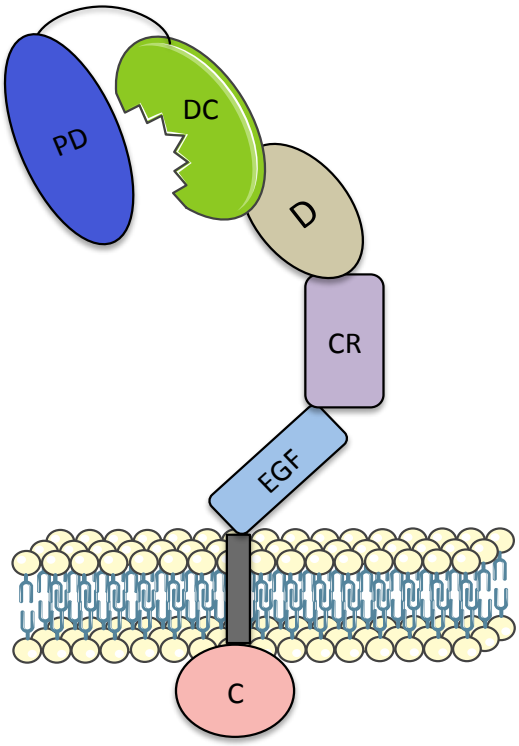


Figure 17 : Représentation schématique des domaines constituant les métalloprotéases.
PD : pro-domaine ; DC : domaine catalytique ; D : domaine désintégrine ; CR : région riche en cystéine ; EGF : domaine EGF-like ; TM : région transmembranaire ; C : région cytoplasmique

La séquence riche en cystéine est hypervariable. Cette séquence jouerait un rôle dans la reconnaissance et la coupure de certains substrats (209).
Les ADAMs sont aussi composées d'un domaine EGF-like suivi d'une région transmembranaire et d'une partie cytoplasmique possédant des sites de phosphorylation.
Il existe dix neuf metalloprotéases de type ADAM TS. Elles sont solubles et se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs motifs thrombospondines capables de lier des protéines telles que la thrombospondine ou l'héparine (Figure 17) (210 , 211).

3.3.1 LES METALLOPROTEASES ADAMS 10 ET 17:

A ce jour, les ADAMs 10 et 17 sont les plus étudiées. ADAM 17 ou Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme (TACE) fut découverte simultanément par deux équipes en 1997 (212 , 213). Comme son nom l'indique, elle fut initialement décrite pour son implication dans la coupure du TNFα.
La métalloprotéase ADAM10 fut clonée pour la première fois en 1996 à partir d'extrait de cerveau bovin. Rapidement, Howard et coll. ont découvert son rôle essentiel dans le développement du système nerveux central (214). Les ADAM 10 et ADAM17 sont activables par de nombreux agents pharmacologiques, tels que l'ionomycine, un ionophore du calcium, et un ester de phorbol, le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) qui activent les PKC.

3.3.1.1 REGULATION DE L'ACTIVITE DES ADAMS 10 ET 17

Les ADAM 10 et 17 sont synthétisées sous forme de zymogène et subissent plusieurs étapes de maturation avant d'exercer leurs fonctions catalytiques (Figure 18).

3.3.1.1.1 Activation par les pro-protéines convertases :

La maturation des ADAMs requiert la coupure de leur pro-domaine afin de rendre accessible le site catalytique de l'enzyme. Cette étape cruciale a lieu dans le trans-Golgi, elle est attribuée à des pro-protéines convertases. La principale pro-protéine convertase est une furine capable de reconnaître le motif consensus RX(R/K)R et de cliver le pro-domaine.

3.3.1.1.2 Activation par les ROS :

La dissociation du pro-domaine est attribuée à l'action d'espèces réactives de l'oxygène. Zhang et coll. proposent que l'activation d'ADAM17 soit consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol d'une cystéine du pro-domaine par l'H_2O_2. Ceci entraînerait la dissociation du pro-domaine du site catalytique de l'enzyme (215).

3.3.1.1.3 Activation par phosphorylation :

La partie C-terminale de ces enzymes possède plusieurs sites de phosphorylation. Le rôle de ces phosphorylations reste très discuté. En effet, la stimulation par des esters de phorbol induit la phosphorylation de la thréonine 735 d'ADAM17 (216) qui serait nécessaire à l'adressage et à la maturation de l'enzyme (217). Cependant, dans un modèle double ko pour ADAM10 et ADAM 17, la transfection du P2X7R, de la molécule ICAM et du mutant ADAM17 tronqué de sa partie intracytoplasmique restaure la coupure d'ICAM après une stimulation au Bz-ATP. Cette étude très convaincante établit donc que la délétion de la région C-terminale d'ADAM17 n'interfère pas dans sa maturation et son activité après la stimulation du P2X7R (218).

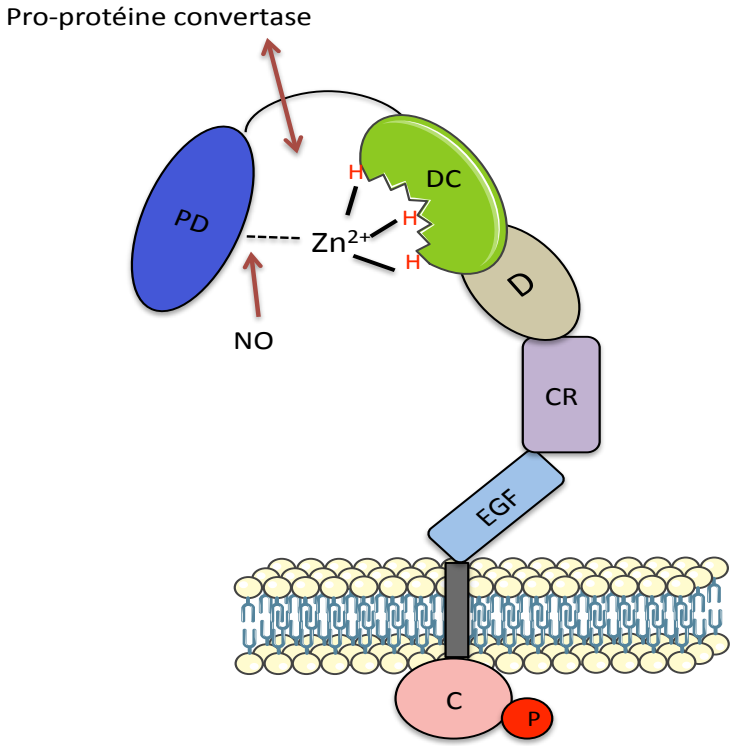


Figure 18 : Mécanisme d'activation des ADAM.
Les ADAM sont activables par différents signaux, notamment la coupure de son pro-domaine par une pro-protéine convertase de type furine ou encore par l'action du nitric oxyde (NO).

3.3.1.1.4 Rôle des tétraspanines dans l'activation d'ADAM10:

Les tétraspanines (tspans) sont des glycoprotéines à quatre passages transmembranaires capables de former un réseau appelé « tetraspanin web ». Ces molécules sont impliquées dans les interactions protéines-protéines. Des expériences de co-immunoprécipitation et de spectrométrie de masse ont mis en évidence l'interaction d'ADAM 10/Kuzbanian (homologue d'ADAM 10 chez *D.melanogaster*) avec les tétraspanines CD9 (219), CD81, CD82 (220) et Tspans12 (221). En 2012, Dornier et coll. ont observé que l'inhibition de la TspanC8 conduit à un phénotype comparable à celui résultant de l'inactivation de la voie Notch. Les auteurs se sont donc intéressés à ADAM10 et ont mis en évidence l'interaction directe entre ADAM10 et la TspansC8. De plus, l'inhibition de l'expression de la TspansC8 entraîne la rétention d'ADAM10 dans le réticulum endoplasmique. A l'inverse, une surexpression de la TspanC8 se traduit par une augmentation d'ADAM10/Kuzbanian à la surface des cellules (222). Les tétraspanines contrôlent ainsi le trafic d'ADAM10 et son adressage à la membrane plasmique. A ce jour, aucune étude n'a montré que les tétraspanines jouent également un rôle dans la régulation d'ADAM17.

3.3.1.1.5 Rôle des iRhoms dans l'activation d'ADAM17:

Les rhomboids constituent une famille de protéases à sérine. Leur activité est portée par une diade catalytique constituée d'une sérine et d'une histidine. Certaines protéines de cette famille (les iRhoms) ont subi une mutation au niveau de leur poche catalytique, les rendant inactives. Récemment, deux équipes ont mis en évidence l'interaction d'ADAM 17 avec iRhom2 (223 , 224). Dans un modèle de macrophages murins « knock-out » pour iRhom2, on observe une inhibition de la coupure protéolytique du TNFα après une stimulation au LPS. L'absence totale de la pro-forme ou de la forme active de TACE à la surface des cellules a poussé les auteurs à étudier le trafic d'ADAM17. Ainsi, ils ont établi qu'iRhom2 est un élément essentiel à la maturation d'ADAM17 en permettant son passage du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (224). Cependant, après la stimulation au PMA de fibroblastes embryonnaires, l'activité d'iRhom2 semble différente. En effet, l'étude de nombreux substrats spécifiques d'ADAM17 (ligands des EGFR, ICAM1, L-sélectine.) montre que l'absence d'iRhom2 entraîne l'inhibition du clivage de certaines molécules uniquement. Ainsi, il semblerait dans ce cas qu'iRhom2 ne soit pas primordiale dans la maturation du pool complet d'ADAM17 mais elle serait impliquée dans la sélectivité de l'enzyme pour son substrat (225).

3.3.1.1.6 Inactivation des ADAMs 10 et 17:

L'activité des ADAMs est finement régulée par des inhibiteurs naturels : les TIMPs. Ces molécules appartiennent à une famille de protéines à deux domaines qui lient les ADAMs et inhibent leurs activités catalytiques. Dans un modèle de souris TIMP-3$^{-/-}$, l'hépatectomie partielle entraîne l'apparition d'un site inflammatoire anormal accompagné d'une libération considérable de TNFα. Ces expériences suggèrent qu'ADAM17 est une de cible majeure de TIMP-3 *in vivo* (226). ADAM 10 est inhibée par TIMP-1 et -3. Par ailleurs, des études *in vitro* utilisant le pro-domaine purifié d'ADAM10 ont montré que celui-ci peut inhiber spécifiquement l'activité d'ADAM10 en empêchant la coupure et la libération de la betacelluline, un ligand des EGFR (227).

3.3.1.1.7 Compensation entre ADAMs 10 et 17:

La sélectivité des enzymes pour leurs substrats est étudiée depuis longtemps. Bon nombre d'études ont établi que certaines molécules telles que la L-sélectine, la TNFα ou le TGFα sont des substrats stricts d'ADAM17. Cependant, des expériences sur la coupure de ces trois substrats dans des fibroblastes embryonnaire de souris (MEFs) déficients en ADAM17$^{-/-}$ ou ADAM10$^{-/-}$ ont permis de mettre en évidence un phénomène compensatoire. En effet, Le Gall et coll. ont montré qu'en l'absence d'ADAM17, ADAM10 est capable de cliver les substrats d'ADAM17. En revanche, la betacelluline qui est un substrat d'ADAM 10 n'est jamais clivée par ADAM17. Cela démontre qu'ADAM10 peut compenser la perte d'ADAM17 mais qu'ADAM17 ne peut pas remplacer ADAM10 (228).

3.3.1.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ADAMS 10 ET 17

La principale fonction des ADAMs est de cliver au niveau juxtamembranaire des protéines de la membrane plasmique permettant ainsi la libération de leurs ectodomaines dans le milieu extracellulaire. Les ectodomaines libérés vont se fixer aux récepteurs correspondant et permettre la transduction de signaux de façon autocrine ou paracrine. Ces enzymes permettent également de réguler l'expression de surface de certains récepteurs.

Les souris invalidées pour ADAM 10 et 17 sont létales. Ces deux protéases ont pour substrats de nombreuses protéines de surface essentielles au développement telles que : Notch, les ligands des récepteurs aux EGF (betacelluline), certaines molécules d'adhésion (L-sélectine, L1CAM, CD44), des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires (IL-6R et IL-15R) et l'APP.

3.3.1.2.1 FONCTIONS BIOLOGIQUES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC)

Dans un cerveau adulte, les ADAM10 et 17 sont exprimées par les astrocytes, les cellules de la microglie et les neurones. Cependant, ADAM10 est exprimée majoritairement dans les cellules neuronales tandis qu'ADAM17 a une expression prédominante dans les cellules gliales (229). Au vu de leurs substrats, ces métalloprotéases jouent un rôle majeur dans les mécanismes de neuroprotection.

3.3.1.2.1.1 Implication dans la neuroprotection :

3.3.1.2.1.1.1 Coupure de l'APP

L'étude du métabolisme et du catabolisme de l'APP présente un intérêt majeur dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer. Cette molécule peut être clivée selon deux voies protéolytiques : l'une génère le fragment aβ neurotoxique, l'autre produit un fragment soluble neuroprotecteur. Cette dernière fait appel à des sécrétases-α de type ADAMs responsables du clivage en position α de l'APP. Cette coupure aboutit à la libération d'un fragment soluble sAPPα connu pour ses propriétés neuroprotectrices et neurotrophiques. En 2004, Postina et coll. ont démontré le rôle majeur d'ADAM10 dans le catabolisme de l'APP *in vivo* (230). Ces résultats seront plus amplement développés dans la partie 4.

3.3.1.2.1.2 Implication dans la croissance et le guidage neuronale :

3.3.1.2.1.2.1 Coupure de Notch

Le récepteur Notch et son ligand delta sont impliqués dans la régulation de la neurogenèse à différents stades du développement. L'interaction Notch/Delta provoque la coupure de Notch par ADAM 10 et (et dans de rare cas par ADAM17). Ce signal aboutit à l'activation du complexe protéique sécrétase-γ responsable de la coupure et de la libération d'un fragment intracellulaire de Notch nommé NICD. Ce fragment va *in fine* migrer dans le noyau et agir sur la transcription de gènes cibles tels que Hes1 qui code la protéine bHLH, importante dans le processus de neurogénèse et la différenciation neuronale (231).

3.3.1.2.1.2.2 Coupure de L1CAM :

La molécule d'adhésion L1CAM est, selon la stimulation, clivée par ADAM10 ou ADAM17 (232). La fonction biologique de la partie extracellulaire de L1CAM a été étudiée en produisant une molécule chimérique composée d'un fragment Fc d'IgG humain associé au domaine extracellulaire de L1CAM. Cette molécule a permis de mettre en évidence le rôle de l'ectodomaine de L1CAM dans la croissance des neurites, l'adhésion et la migration cellulaire (233). Par ailleurs, après coupure par ADAM10 ou ADAM17, un second clivage par une sécrétase-γ va générer (comme dans le cas de Notch) un fragment intracellulaire de L1CAM. Ce fragment migre dans le noyau et régule l'expression de NSB1, protéine essentielle au processus de réparation de l'ADN (232 , 234).

3.3.1.2.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES DANS L'INFLAMMATION :

3.3.1.2.2.1 Le TNFα et son récepteur

ADAM17 fut décrite initialement pour sa faculté à cliver et à libérer la forme mature du TNFα. La fixation du ligand aux récepteurs TNFR1 ou TNFR2 entraîne l'activation de la voie de signalisation NFκB impliquée dans le processus inflammatoire. Néanmoins, ADAM17 est aussi responsable de la coupure du TNFR1 et du TNFR2. Le clivage de ces récepteurs conduit à une diminution de la réponse cellulaire au TNFα. En effet, la forme soluble du récepteur est capable de lier son ligand et d'en diminuer les effets.

3.3.1.2.2.2 Récepteur à l'interleukine 6 :

L'interleukine 6 est une cytokine pléiotropique agissant sur de nombreux types cellulaires. *In vivo* l'IL-6 joue un rôle important dans la réponse immunitaire humorale et dans la réaction inflammatoire. Pour exercer ses fonctions, l'IL-6 doit se fixer à sa sous-unité réceptrice IL-6R. Une fois le complexe hétérodimérique IL-6-IL-6R formé, celui-ci va s'associer à la protéine de membrane gp130, responsable de la transduction du signal. Différentes études ont montré que le récepteur à l'IL-6 peut se trouver sous forme soluble et fonctionnel dans le sérum. La forme soluble de l'IL-6R peut être générée par épissage alternatif ou par l'action protéolytique d'ADAM10 et 17 (235).

4. LE PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE (APP)

4 .1 LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer (MA) est la plus fréquente des démences (70% des démences en France). C'est une maladie neurodégénérative qui se traduit par une altération des fonctions cognitives associée à des lésions spécifiques du cerveau. En raison de la population vieillissante, le nombre de cas répertoriés ne cesse de croître, devenant un enjeu de santé publique.

4.1.1 ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

A ce jour, on dénombre en France 850 000 personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Chaque année 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués, et on estime à 1 275 000 le nombre de malades dans huit ans (http://www.francealzheimer.org). Cette démence est dite sénile car elle affecte principalement les personnes âgées bien qu'il existe quelques cas précoces. La prévalence de la MA augmente avec l'âge passant en moyenne de 6% entre 75 et 79 ans à 30% après 85 ans (Tableau 5). D'autre part, les données épidémiologiques indiquent qu'il existe une disparité homme-femme dans la prévalence de la MA. Le sexe semblerait donc être un facteur de risque (236). Ainsi, les femmes sont plus touchées que les hommes, avec 38,4% pour les femmes contre 23,9% pour les hommes à partir de 85 ans. Cependant, cette affirmation reste controversée. De nombreux épidémiologistes expliquent cette différence par l'espérance de vie plus élevée chez les femmes.

Age (ans)	Femme	Homme
75-79	5,7	7,7
80-84	16,6	12,5
>85	38,4	23,9

Tableau 5 : Prévalence (%) de la maladie d'Alzheimer et syndromes apparentés en fonction de l'âge et du sexe en France.

Données de l'étude PAQUID (Personnes Agées Quid).

4.1.2 HISTORIQUE DE LA MALADIE

Jusqu'à la fin du XIXe siècle, les psychiatres considéraient la démence comme une maladie « normale » affectant uniquement les personnes âgées. En 1907, Aloïs Alzheimer, un neuropathologiste publie une étude anatomo-clinique concernant une patiente âgée de 51 ans Auguste D. Celle-ci présentait « un délire de jalousie suivi d'une désintégration des fonctions intellectuelles » aboutissant à son décès prématuré. A l'autopsie, l'analyse histologique du cortex cérébral a révélé des plaques séniles, déjà répertorié dans les cas de démence, associée à des lésions encore inconnues. Pour la première fois, Alzheimer met en évidence l'apparition anormale de conglomérats de fibres intraneuronales auxquels il donnera le nom de dégénérescence neurofibrillaire (DNF). En 1912, Kraepelin, dans son Traité de Psychiatrie individualise cette maladie et lui attribue le nom d'Alzheimer. Kraepelin définit dés lors la maladie comme une « démence du sujet jeune, rare et dégénérative », la dissociant de la démence sénile.

A la fin du XXème siècle, les connaissances scientifiques ont permis d'appréhender les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la MA. Ainsi, en 1984 Glenner & Wong caractérisent l'élément constituant les plaques séniles : le peptide amyloïde β (aβ) (237). En 1986, Brion et coll. découvrent que les DNF sont constituées de la protéine Tau (tubule-associated unit) (238) et Grundke-Iqbal et coll. mettent en évidence son hyperphosphorylation anormale dans la MA (239). La protéine Tau est rapidement considérée comme un marqueur du processus neurodégénératif (240). En 1987, l'origine du peptide aβ est associée à la coupure du précurseur de la protéine amyloïde (APP). Ce n'est qu'en 1995, que le peptide aβ est décrit pour ses propriétés neurotoxiques (241), le mettant plus tard au centre de l'hypothèse de la cascade amyloïde responsable de la MA.

Les données moléculaires et le développement de l'imagerie cérébrale ont permis d'affiner les critères de diagnostique, d'établir des degrés de sévérité et de définir la MA comme étant une affection neurodégénérative affectant principalement les personnes âgées. (http://www.alzheimer-adna.com/Vcdn/Decouvertes.html)

4.1.3 SYMPTOMES CLINIQUES ET DIAGNOSTIC DE LA MA

La MA est une affection neurodégénérative à évolution progressive. Elle se décompose en trois phases.

Phase initiale : lors de cette phase, le patient présente des troubles de la mémoire épisodique ainsi qu'une désorientation spatiale. Cette amnésie de type hippocampique se caractérise par

la perte de souvenirs récents tandis que les souvenirs anciens sont conservés. Il est rare de poser un diagnostic claire de MA durant cette phase.

Phase intermédiaire : les troubles mnésiques et la désorientation spatio-temporelle vont être plus prononcés et seront associés à d'autres symptômes. Les patients vont développer des troubles du comportement (désinhibition sociale, paranoïa etc). À ces troubles s'ajoute une **aphasie** (trouble du langage), une **apraxie** se définissant par une altération de la capacité à réaliser une activité motrice alors même que les fonctions sont intactes et une **agnosie** se traduisant par l'incapacité de reconnaître ou d'identifier des objets usuels. L'apparition progressive de ses troubles cognitifs conduit à une perte d'autonomie du patient.

Phase avancée : lors de cette dernière phase, les symptômes précédemment décrits s'aggravent aboutissant, *in fine* au décès du patient.

Les critères diagnostics de la MA sont encore en cours d'étude. La discrimination entre la MA et les autres maladies neurodégénératives reste délicate. Les études actuelles visent à identifier des marqueurs biologiques spécifiques de la pathologie.

Analyse du LCR :

Le dosage des peptides aβ42, de la protéine Tau totale et de la protéine Tau phosphorylée du liquide céphalo-rachidien donne une indication sur le processus amyloïde, la dégénérescence neurofibrillaire et la mort neuronale.

Imagerie fonctionnelle :

D'un point de vue anatomique, l'imagerie par résonance magnétique permet de visualiser et de quantifier l'atrophie cérébrale. L'utilisation de ligands se fixant aux plaques amyloïdes permet d'analyser la charge amyloïde par PET scan.

Analyse génétique :

Chez le sujet jeune, l'apparition de trouble cognitifs et la suspicion d'une maladie neurodégénérative entraîne une analyse des gènes mis en cause dans la MA (gène de l'APP, PSEN1 et PSEN2).

Bien que le diagnostic se renforce avec l'évolution des symptômes et l'étude des biomarqueurs, le diagnostic de certitude n'est posé qu'après l'observation des lésions cérébrales lors de l'examen post-mortem.

4.1.4 DIFFERENTES FORMES DE LA MA :

On distingue actuellement deux formes de la MA.

4.1.4.1 Forme sporadique de la MA

La forme sporadique de la MA est dite tardive car les premières atteintes sont observées après 65 ans. Environ 95% des malades souffrent de la forme sporadique. De nombreux facteurs environnementaux sembleraient être à l'origine de cette forme : l'alimentation (cholestérol), le stress (cortisol)... Cependant, il existe tout de même une susceptibilité génétique.

4.1.4.1.1 Le gène ApoE4

Le gène *ApoE4* représente le plus grand risque génétique de développer la forme tardive de la MA. Trois variants allèliques sont connus : *ApoE2, ApoE3 et ApoE4.* Ils codent des protéines en charge du transport du cholestérol. De nombreuses études indiquent que les porteurs des formes allèliques *ε4/ε4* ont 50% de risque de développer la MA. Ainsi, 40% des malades sont porteurs de ces allèles contre 15% dans la population générale.

4.1.4.1.2 Autres loci de susceptibilité

D'autres loci de susceptibilité ont été identifiés par des recherches d'association sur l'ensemble du génome (GWAS = Genome-wide association studies). Dans un premier temps, trois gènes associés à la maladie d'Alzheimer ont été trouvés (242) (243). Ils codent : (1) la Clusterine ou apolipoprotein J localisée sur le chromosome 8 ; (2) le récepteur au complément (3b/4b) CR1 situé sur le chromosome 1 ; (3) *PICALM* sur le chromosome 11. Des études biologiques suggèrent fortement que la clusterine et le CR1 sont impliqués dans la clairance des peptides amyloïdes qui sont à l'origine des plaques séniles. D'autre part, la molécule PICALM semble être impliquée dans le trafic intracellulaire de facteurs de croissance et de neurotransmetteurs médié par la clathrine. Récemment, dans le cadre du consortium international I-GAP (pour International Genomics of Alzheimer Project), les chercheurs ont identifié 11 nouveaux gènes impliqués dans la survenue de la maladie. Cette étude réalisée en deux étapes sur 8572 patients et 11312 témoins, a permis de confirmer la découverte des 11 nouveaux gènes et d'en repérer 13 autres en cours de validation. La découverte de ces gènes tend à améliorer la compréhension de la pathologie et à confirmer certaines hypothèses. L'implication du gène HLA-DRB5/DRB1 (et dans une moindre mesure des gènes INPP5D, MEF2C) renforce les résultats précédemment observés dans l'étude GWAS (CR1, TREM2) et confirme l'importance du système immunitaire et du processus inflammatoire dans la

maladie. D'autre part, certains de ces gènes codent des protéines ayant une fonction dans la voie amyloïde ou dans la toxicité liée à la protéine Tau (244).
Ces nouvelles données permettent de mieux appréhender la physiopathologie et la complexité de la MA d'un point de vue moléculaire mais également d'établir le profil génétique des personnes à risques.

4.1.4.2 Forme héréditaire (ou familiale) de la MA

Parallèlement à la forme sporadique qui concerne la majorité des patients touchés par la MA, certaines mutations génétiques prédisposent à la MA. En effet, la forme héréditaire (ou familiale) de la MA est à transmission monogénique autosomique dominante. Les personnes porteuses de ces mutations développent un Alzheimer précocement, avant 60 ans. La forme familiale constitue 1% des cas.

A l'heure actuelle, trois gènes ont été identifiés comme étant à l'origine de la MA.

- Mutations PSEN1 (préséniline1) : 70% des patients atteints de la forme monogénique présentent des mutations de ce gène localisé sur le chromosome 14. Ce gène code une protéine du complexe sécrétase-γ.
- Mutations APP : ce gène est situé sur le chromosome 21 et touche 10% des patients.
- Mutations PSEN2 : Les mutations de ce gène localisé sur le chromosome 1 concerne 2% des cas.

L'analyse de ces trois gènes a permis de recenser plus de 200 mutations différentes responsables de la surproduction des peptides toxiques aβ.
Néanmoins, dans 20% des cas de forme héréditaire de la MA aucune mutation n'a encore été identifiée.

4.1.5 CARACTERISTIQUES NEUROPATHOLOGIQUES DE LA MA

4.1.5.1 Altération macroscopique

Les analyses anatomiques des cerveaux révèlent une atrophie cérébrale importante affectant principalement l'hippocampe, le lobe temporal et l'amygdale (Figure 19) (245). La diminution du volume de ces structures reflète une perte neuronale massive (246). Cette atrophie peut s'accompagner dans certains cas d'une dilatation du système ventriculaire, d'un élargissement des sillons corticaux et d'un agrandissement des espaces péri-vasculaires.

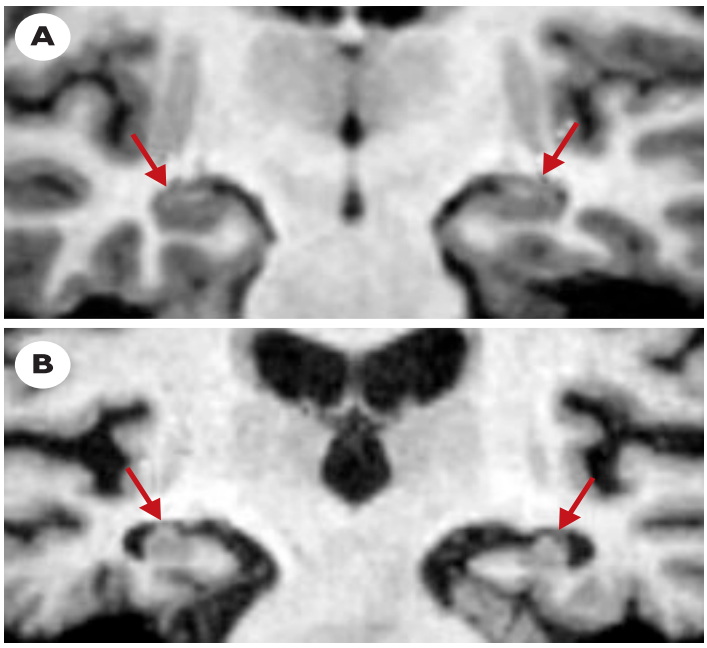


Figure 19 : Atrophie hippocampique dans la MA.

Coupe coronale passant par le corps hippocampique (flèches) d'un sujet témoin (A) et d'un patient atteint de la MA (B). Il existe une atrophie des formations hippocampiques chez le sujet malade (246).

4.1.5.2 Altération microscopique : lésions histologiques liées à la maladie

Les examens anatomo-pathologiques des cerveaux ont permis de mieux cerner les mécanismes aboutissant à la maladie. Ainsi, deux types de lésions cérébrales semblent à l'origine de cette perte neuronale: i) l'apparition de plaques séniles ; ii) une dégénérescence neurofibrillaire.

4.1.5.2.1 Les plaques séniles.

L'analyse histologique des cerveaux de patients atteints de la MA montre l'apparition de dépôts protéiques : les plaques séniles (Figure 20). Les plaques séniles sont constituées en leurs cœurs de peptides aβ agrégés formant *in fine* des fibrilles. Dans les premiers stades de la maladie, elles sont localisées dans la zone du cortex préfrontal et temporal, progressent jusqu'au néocortex pour finalement atteindre le tronc cérébral et le cervelet.

Il est important de noter que les plaques amyloïdes sont parfois retrouvées dans les cerveaux de personnes âgées ne présentant pas de démences.

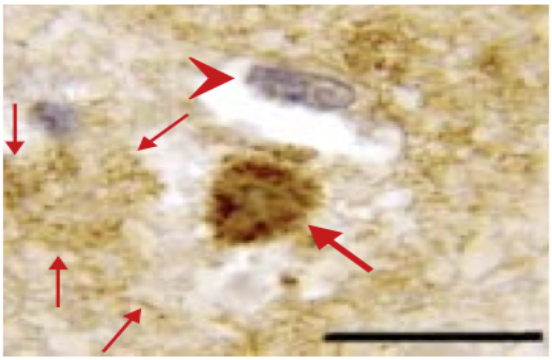


Figure 20 : Aspect des plaques séniles dans la MA à l'examen microscopique.

Immunohistochimie du peptide aβ. Un dépôt dense de peptide aβ (grande flèche) occupe le centre de la plaque sénile. Elle est entourée d'un halo de dépôt diffus (petites flèches). Un noyau de macrophage est marqué par une tête de flèche (246).

4.1.5.2.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les lésions de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) sont formées par l'accumulation de neurofilaments anormaux dont le principal constituant est la protéine Tau (Figure 21). Cette protéine est fortement exprimée dans les cellules neuronales et est associée au microtubule qui est un élément essentiel du cytosquelette. Dans la tauopathie de type Alzheimer, cette protéine est anormalement phosphorylée entraînant son agrégation dans le cytoplasme des neurones. Associées à d'autres phénomènes tels que l'amyloïdogenèse, ces neurofibrilles provoquent la mort neuronale.

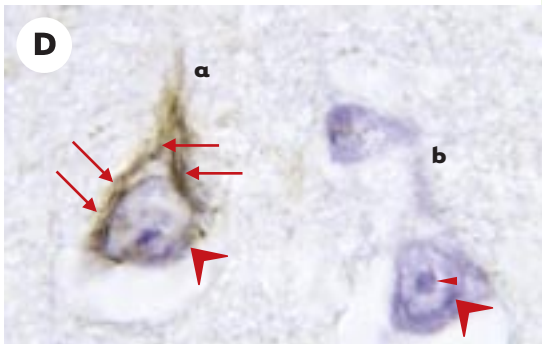


Figure 21 : Aspect des DNF dans la MA à l'examen microscopique.

Immunohistochimie de la protéine tau. Deux neurones sont visibles (marqués a et b). Le noyau est indiqué par une grosse tête de flèche, le nucléole par une petite tête de flèche. La dégénérescence neurofibrillaire est constituée par des fibrilles de protéine tau dans le corps cellulaire du neurone a (flèches) (246).

4.1.5.2.3 Inflammation dans la MA

La composante inflammatoire est importante durant la pathogénèse de la MA. L'autopsie des cerveaux de patients atteints d'Alzheimer a révélé une forte activation microgliale (cellules immunitaires résidentes du système nerveux central) et astrocytaire au voisinage des plaques séniles. Les peptides amyloïdes ont des propriétés immunogènes et sont capables d'activer le complément (247). De plus, une augmentation des cytokines pro-inflammatoire IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8, TGF-β et MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1α) est constatée dans le LCR (248). Les peptides amyloïdes conduisent notamment à l'activation de l'inflammasome NLRP3 responsable de la maturation de l'IL-1β dans la microglie (81). Afin d'évaluer l'impact de l'activation de NLRP3 et de la caspase 1 dans la maladie d'Alzheimer, des chercheurs ont étudié la mémoire et les fonctions cognitives dans des modèles de maladie d'Alzheimer (APP/PS1) murins déficients en NLRP3 ou en caspase 1. Ces animaux semblent être « protégés » de la perte de mémoire. Ils ont également observé une diminution des dépôts amyloïdes et une clairance accrue des peptides aβ. Ainsi, l'inhibition de NLRP3, de la caspase 1 ou de l'IL-1β pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (249).

4.1.6 HYPOTHESE DE LA CASCADE AMYLOÏDE

L'hypothèse de la cascade amyloïde positionne le peptide aβ42 comme l'élément central conduisant à la MA (Figure 22). Cette hypothèse se base sur l'observation des formes monogéniques qui, rappelons le, ne représentent que 1% des cas. Dans cette théorie, l'apparition des plaques amyloïdes aurait pour conséquences la mise en place du processus inflammatoire et la formation des DNF. Actuellement, cette hypothèse fait l'objet de nombreux débats. En effet, de nombreux éléments vont à l'encontre de cette théorie :

- La présence de plaques amyloïdes dans le cortex et l'hippocampe de personnes âgées exemptes de toute démence (250).
- La présence de DNF en l'absence de dépôts amyloïdes suggère que la formation des enchevêtrements neurofibrillaires n'est pas obligatoirement une conséquence de l'accumulation de aβ.
- L'absence de corrélation entre le taux de plaques amyloïdes et la mort neuronale.
- L'équipe du Dr Lannfelt a observé une forme de la maladie sans développement des plaques amyloïdes (251).

D'autres arguments sont en faveur de cette hypothèse :

- Les mutations des gènes impliqués dans l'augmentation de la production du peptide aβ conduisent à un phénotype Alzheimer.
- Des souris C57BL/6, dont le complexe ADAM10/SAP97 a été inhibé, développent la forme sporadique de la MA. On observe une augmentation des peptides amyloïdes ainsi qu'une hyperphosphorylation de Tau suggérant que le catabolisme de l'APP entraîne une altération de la phosphorylation de Tau (252).
- Les animaux transgéniques ont permis d'observer que les dépôts amyloïdes précédent la tauopathie (253).

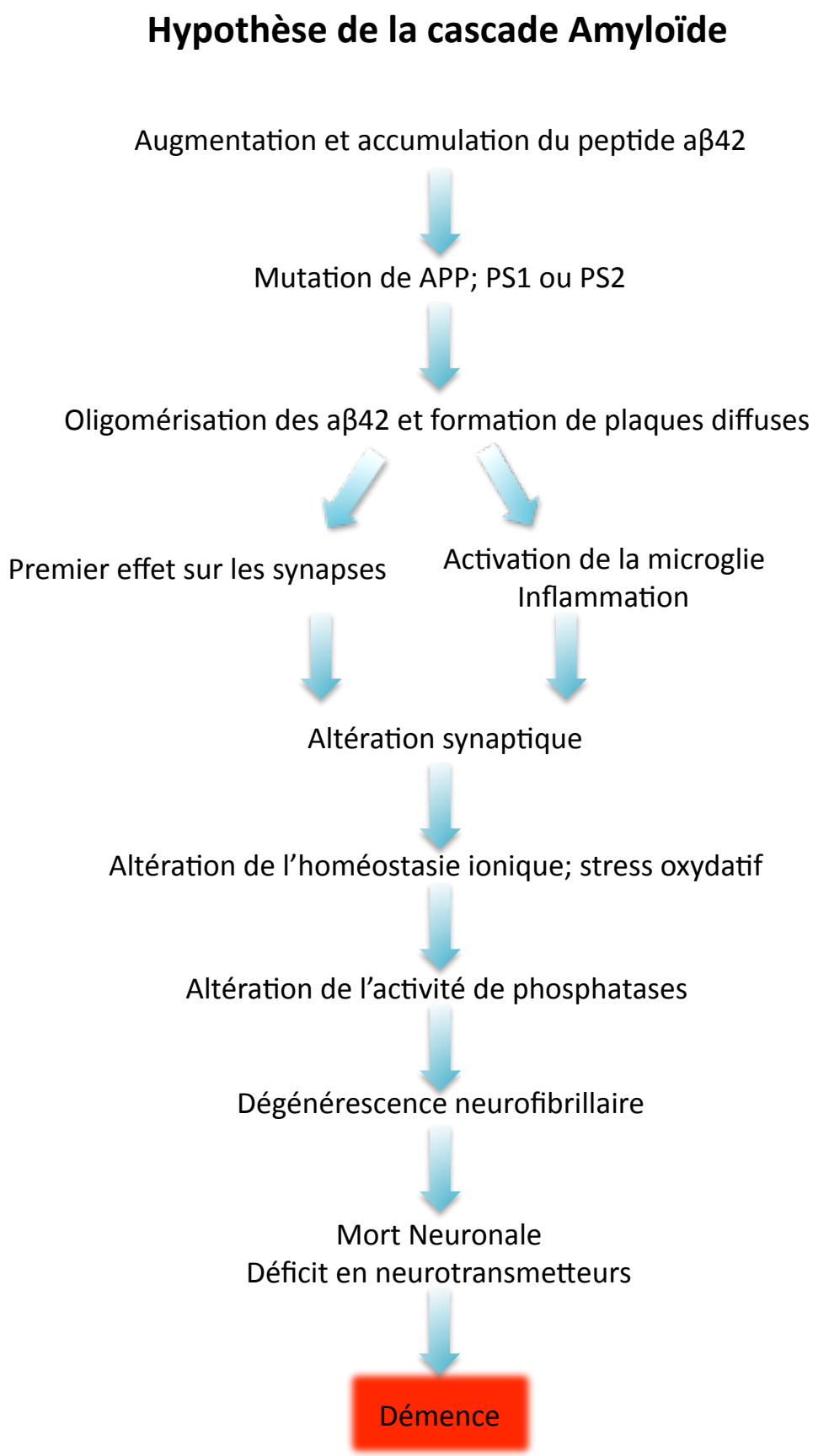


Figure 22 : Hypothèse de la cascade amyloïde (Modifiée de (254)).

4.2 METABOLISME DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE

Le précurseur de la protéine amyloïde (APP), également appelé Holo-APP appartient à une famille de protéines très conservées dans l'évolution. Cette famille inclut les protéines APLP-1 et -2 (amyloid precursor like protein) chez les mammifères, APP747 chez le xénope, APL-1 chez *C. elegans*, et APPL (APP-like) chez la drosophile. Chez l'Homme, l'APP et les molécules APLP-1 et -2 présentent une forte homologie de séquence. Celles-ci sont soumises au même processus de coupure par des sécrétases-α, -β et -γ. Cependant, contrairement à l'APP, le catabolisme de APLP-1 et -2 ne génère pas de peptides toxiques.

4.2.1 STRUCTURE, ISOFORMES ET EXPRESSION DE L'APP

Le peptide aβ, constituant des plaques séniles est issu du clivage protéolytique du précurseur de la protéine amyloïde APP. L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1, ayant une expression ubiquitaire chez l'Homme. Elle possède une importante partie extracellulaire et une courte région intracellulaire. Le locus du gène codant l'APP est localisé sur le chromosome 21q21. Il existe trois isoformes majeures de l'APP issues d'un épissage alternatif et possédant 695, 751 et 770 acides aminés (Figure 23).

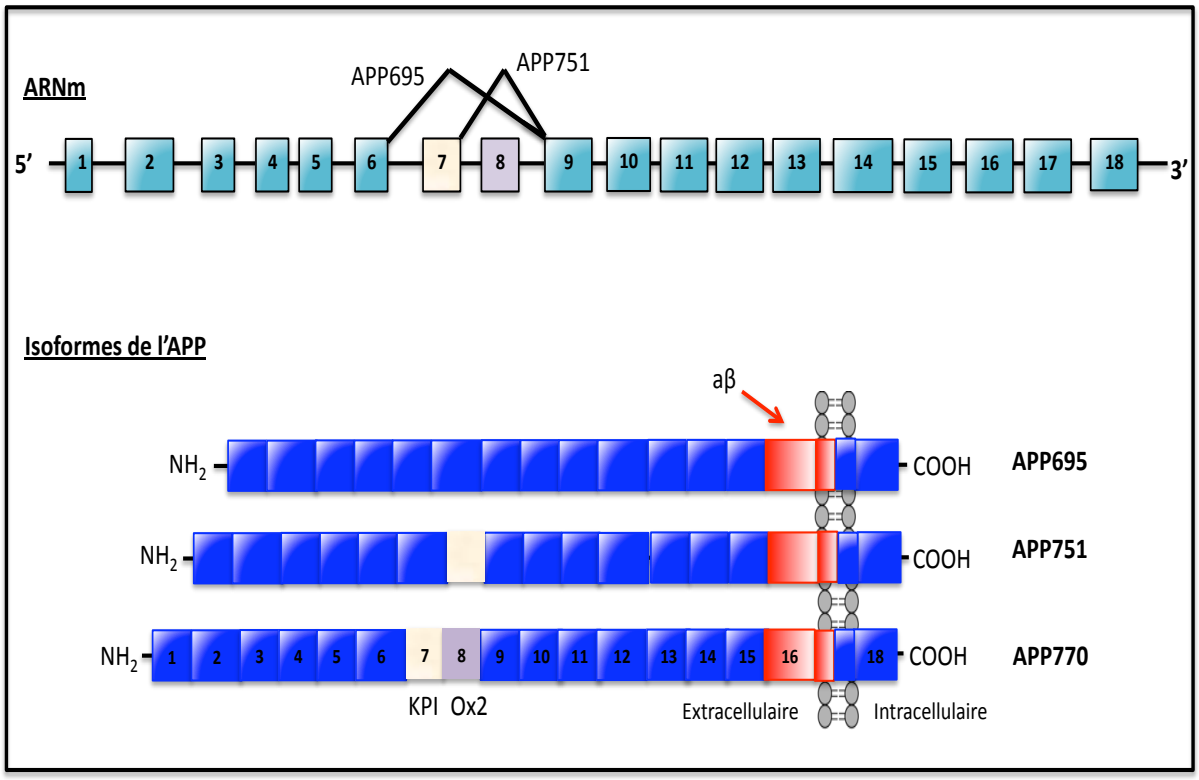


Figure 23 : Isoformes de l'APP issues d'un épissage alternatif.
Les formes 770, 751 et 695 sont issues de l'épissage alternatif des exons 7 et/ou 8 codant respectivement le domaine inhibiteur de sérine protéase de type Kunitz (KPI) et le domaine Ox2.

L'APP770 est principalement exprimée dans les cellules non neuronales. L'APP695 a une expression restreinte au système nerveux et est majoritaire dans les cellules neuronales tandis que l'APP751 est fortement exprimée dans les astrocytes. Ces isoformes se distinguent par l'absence (APP695) ou la présence (APP750 et 770) d'un domaine inhibiteur de sérine protéase de type Kunitz (KPI).

4.2.2 MATURATION ET ADRESSAGE DE L'APP

Au cours de sa maturation, l'APP peut subir trois modifications post-traductionnelles : une phosphorylation sur la thréonine 668 de l'APP695, des N- et O-glycosylations dans sa partie extracellulaire et des palmitoylations qui sont essentielles à son adressage et à sa fonction.

L'APP est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (RE) dans lequel il va subir une première étape de maturation. Des expériences *in vitro* et *in vivo* sur des souris C57BL/6 ont montré qu'une partie de l'APP situé dans les radeaux lipidiques est palmitoylé par les enzymes PATs DHHC7 et DHHC21. La palmitoylation de l'APP sur les résidus cystéines 186 et/ou 187 permet la sortie de l'APP du réticulum endoplasmique (255).

Après sa synthèse, l'APP passe rapidement du RE à l'appareil de Golgi (AG). Dans l'AG précoce, la protéine subit une seconde étape de maturation en étant N-glycosylée. L'APP est ensuite acheminée au Trans-Golgi où elle est O-glycosylée. L'APP est alors sous sa forme mature et peut être adressé à différents compartiments cellulaires. Lors des étapes de maturation dans l'appareil de Golgi, une forte proportion de l'APP est directement adressée au lysosome où il est dégradé tandis qu'environ 10% de l'APP mature est destiné à la membrane plasmique. Bien que la majorité de l'APP se situe dans les domaines non résistants au détergent, une faible quantité d'APP est retrouvé dans les radeaux lipidiques. De manière intéressante, l'APP palmitoylé est localisé dans les radeaux lipidiques. Ainsi, les auteurs montrent que la palmitoylation des résidus N-terminaux constitue un signal de sortie de RE et d'adressage dans les radeaux lipidiques (255).

L'extrémité C-terminale contient la séquence signal d'endocytose YENPTY. La majorité de l'APP exprimée à la surface des cellules va être endocytée par une voie dépendante de la clathrine. Ces microvésicules vont fusionner avec les endosomes précoces, dans lesquels l'APP va subir deux coupures par des sécrétases-β puis des -γ conduisant à la genèse de peptides aβ. Cette voie est dite amyloïdogénique. L'APP non clivé sera dégradé dans les lysosomes.

Une faible fraction de l'APP ne sera pas endocytée et approximativement 10% de l'APP membranaire sera coupée par des sécrétases α puis γ aboutissant à la voie dite non amyloïdogénique.

4.2.3 FONCTIONS DE L'APP

L'APP est une protéine très conservée au cours de l'évolution suggérant un rôle physiologique important. Afin de mieux comprendre les fonctions de l'APP, des souris invalidées pour le gène de l'APP ont été générées. Bien que ces souris soient viables et fertiles, elles présentent de nombreuses anomalies cliniques et histologiques telles qu'une gliose réactive, une diminution de l'activité locomotrice, une diminution du taux de synaptophysine aux niveaux néocortical et hippocampique, un faible poids et une réduction du poids du cerveau suggérant un rôle important de l'APP dans le développement (256). Durant le développement cérébral, l'APP interagit avec les protéines DISC-1 (disrupted in schizophrenia 1) et Disabled-1 (257) provoquant la migration des précurseurs des cellules neurales au niveau de la plaque corticale (258).

Une étude plus récente suggère que les pancortines, des protéines exprimées durant le développement du cortex cérébral et capables de réduire l'activité sécrétase β, lient l'APP et promeuvent la migration des cellules neuronales (259).

D'autre part, l'APP est également nécessaire à la formation des jonctions neuro-musculaires où l'APP co-localise avec les récepteurs à l'acétylcholine (260).

La partie extracellulaire de l'APP interagit avec différents acteurs moléculaires de la matrice extracellulaire, notamment la laminine (261) et le collagène de type I (262) suggérant un rôle de l'APP dans l'adhésion cellule-matrice extracellulaire et dans l'adhésion cellule-cellule (263). De plus, l'APP contribue à l'agrégation plaquettaire par son domaine inhibiteur de sérine protéase KPI ainsi qu'à la mort neuronale par apoptose (264).

4.3 CATABOLISME DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE

4.3.1 VOIE AMYLOÏDOGENIQUE ET VOIE NON AMYLOÏDOGENIQUE

L'APP possède de nombreux sites de coupure reconnus par des sécrétases-α, -β et -γ. Au cours des différentes étapes de sa maturation, l'APP est soumise à deux voies protéolytiques menant à la formation de nombreux fragments (Figure 24).

4.3.1.1 Description de la voie amyloïdogénique

La première voie est dite amyloïdogénique et fait appel à une coupure séquentielle par une sécrétase-β puis un complexe sécrétase-γ. L'action de ces deux enzymes conduit à la libération de trois fragments :

- un fragment soluble sAPPβ, qui est libéré dans le milieu extracellulaire et joue un rôle dans la mort neuronale.
- des peptides aβ, principalement composés de 40 ou 42 acides aminés. Ces peptides ont la capacité de s'agréger et sont à l'origine des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer.
- un fragment intracellulaire AICD de 3kDa agissant comme un facteur de transcription.

4.3.1.2 Récepteurs impliqués dans la voie amyloïdogénique

De nombreux récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) sont capables de réguler l'activité et le trafic des sécrétases impliquées dans la voie amyloïde. Après activation, certains RCPG sont co-internalisés avec les sécrétases -β et -γ dans les endosomes par une voie dépendante de la clathrine. Parmi ces récepteurs, nous citerons les récepteurs aux opioïdes δ (DOR) et β-2Adrénergiques (β2A) (265). Ces deux récepteurs sont exprimés dans l'hippocampe et le cortex, les principales zones touchées dans la MA. Des études ont montré que ces deux récepteurs sont capables d'interagir avec la sous-unité PS1 de la sécrétase-γ et favoriseraient la production des peptides aβ. En effet, des études ont montré que l'administration de naltrindole un antagoniste sélectif des DOR, ou l'invalidation génique des récepteurs DOR, aboutit à l'amélioration de l'apprentissage spatiale et à la diminution des plaques amyloïdes *in vivo*. De même, l'agoniste du récepteur β2A augmente la charge amyloïde, tandis que le traitement avec un antagoniste inhibe la production de aβ, *in vitro* et *in vivo* (266).

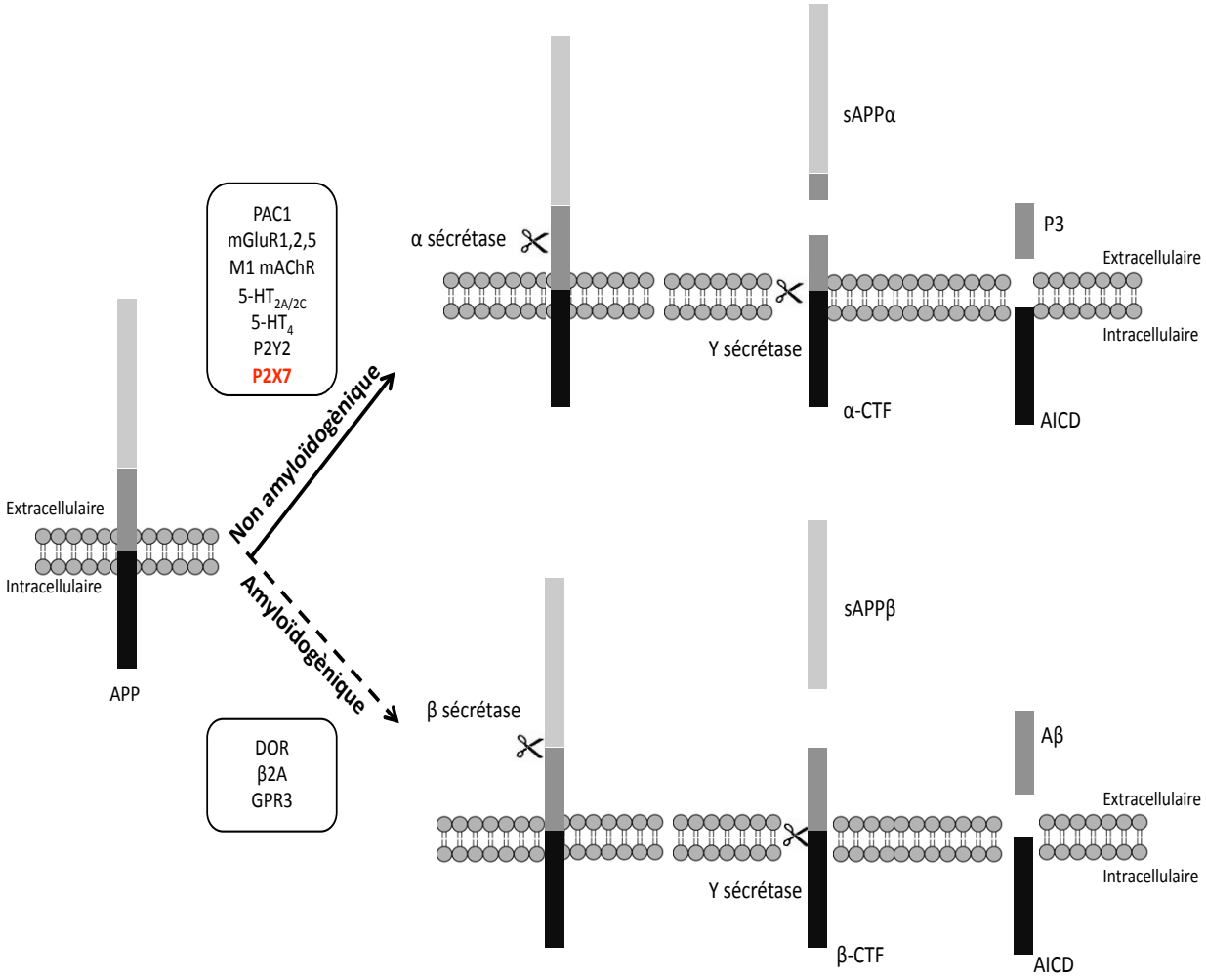


Figure 24 : Coupure du précurseur de la protéine amyloïde (APP) par les sécrétases.

La coupure protéolytique de l'APP met majoritairement en jeu la voie non amyloïdogénique (flèche pleine) ; L'APP est clivé par une sécrétase-α dans le fragment correspondant au peptide β amyloïde (gris foncé) et aboutit à la sécrétion du fragment soluble sAPPα empêchant ainsi la production du peptide aβ. Le fragment α C-terminal est ensuite coupé par une sécrétase-γ libérant un peptide P3 et un fragment intracellulaire AICD (APP intracellular domain). La voie non amyloïdogénique (flèche pointillée) fait intervenir une sécrétase-β qui libère le fragment sAPPβ. Une sécrétase-γ va couper le fragment β-CTF et libérer le peptide toxique aβ et l'AICD.

4.3.1.3 Description de la voie non amyloïdogénique

Cette voie est en équilibre avec la voie amyloïdogénique. Elle se caractérise par la coupure de l'APP par une sécrétase α puis une γ aboutissant à la libération dans le milieu extracellulaire :

- du fragment soluble neuroprotecteur APPα,
- d'un peptide hydrophobe P3 constitué de 24 à 26 acides aminés

et du fragment AICD dans le milieu intracellulaire .

4.3.1.4 Récepteurs impliqués dans la voie non amyloïdogénique

L'étude des voies biochimiques aboutissant à la libération des fragments neuroprotecteurs sAPPα est indispensable à l'identification de nouvelle cible thérapeutique.

4.3.1.4.1 Récepteurs de type RCPG

De nombreux RCPG activent la voie non amyloïdogénique. L'activation des récepteurs muscarinique M1 (M1 mAChR), des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), des récepteurs sérotoninergiques (5-$HT_{2a/2c}$ et 5-HT_4) et du récepteur PAC1 modulent également la coupure en α de l'APP (265).

En effet, l'activation du récepteur PAC1 par le peptide PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) induit la libération de sAPPα en activant la sécrétase α ADAM10. Il entraîne une amélioration des fonctions cognitives. Cette voie biochimique est régulée par la PI3Kinase et les kinases ERK1/2 (267). De plus, *in vivo* l'administration de PACAP entraîne une réduction de l'ARNm codant le récepteur transporteur du peptide aβ (RAGE) impliqué dans le processus inflammatoire et une augmentation de l'expression de la néprilysine responsable de la dégradation des peptides amyloïdes (268).

De même, l'activation du récepteur 5-HT_4 entraîne la production du fragment neuroprotecteur sAPPα et réduit la charge amyloïde via une voie biochimique originale. Cette voie, indépendante de la PKA, est régulée par l'augmentation intracellulaire d'AMPc qui va activer la protéine Epac via Rap1 et Rac (269). De plus, l'interaction entre le récepteur 5-HT_4 et la sécrétase α ADAM10 favorise la voie non amyloïdogénique en agissant probablement dans la maturation ou le trafic de l'enzyme. Cependant, les mécanismes molécuaires mis en jeu ne sont pas encore élucidés (270).

4.3.1.4.2 Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques P2Y2 et P2X7 sont également connus pour stimuler le clivage en α de l'APP (271 , 272).

4.3.1.4.2.1 Le récepteur P2Y2

Le récepteur P2Y2 est un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine Gq. Ce récepteur peut être stimulé aussi bien par l'ATP que l'uridine 5' triphosphate (UTP). Camden et coll. ont montré qu'après transfection de l'astrocytome humain 1321 N1 par l'ADN codant le récepteur P2Y2 humain, la stimulation de ce récepteur entraînait la libération

du fragment soluble sAPPα (271). Ils ont établi par ARN interférent, que l'activation du P2Y2 aboutissait à la stimulation d'une activité sécrétase-α qui serait due aux enzymes ADAM10 et 17. Par la suite, le même groupe a démontré que la stimulation par l'IL-1β de neurones primaires de cortex de rat entraînait une sur-expression du récepteur P2Y2 qui après activation par l'UTP provoquait une libération de sAPPα par une voie biochimique mettant en jeu les métalloprotéases ADAM10 et 17 (273). Ainsi dans ce modèle, les auteurs montrent qu'une cytokine pro-inflammatoire comme l'IL-1β est capable de stimuler l'expression du récepteur P2Y2 sur des neurones corticaux et de favoriser le clivage non-amyloïdogénique de l'APP.

4.3.1.4.2.2 Le récepteur P2X7

Au sein du laboratoire, le Dr Delarasse a démontré que l'activation du P2X7R par l'ATP ou le Bz-ATP provoque une coupure protéolytique de l'APP et libère le fragment neuroprotecteur sAPPα. Ce résultat a été obtenu dans plusieurs lignées cellulaires : les cellules neurales progénitrices (NPCs), les cellules de neuroblastomes murin (Neuro-2a) ou humain (SK-N-BE) et les astrocytes primaires de souris. En effet, ils ont démontré que la coupure est dépendante du P2X7R par trois stratégies. (1) en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques sélectifs de P2X7R tels que A-438079 et l'o-ATP, (2) à l'aide d'ARN interférents spécifiques de P2X7R, (3) grâce à des cultures primaires d'astrocytes et de cellules neurales progénitrices invalidées pour le récepteur P2X7 (Figure 25).

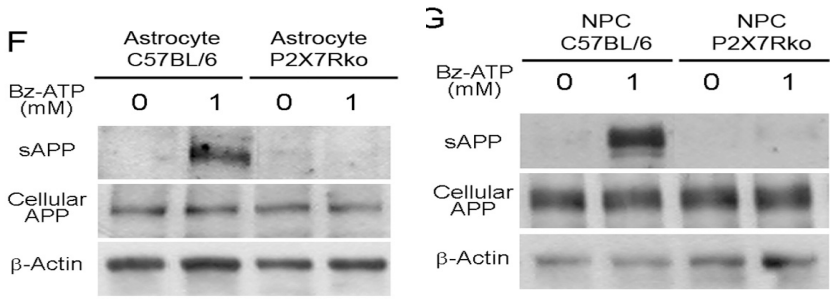


Figure 25 : La stimulation du récepteur P2X7 par le Bz ATP aboutit à la libération du fragment soluble sAPPα.

Analyse des surnageants et des lysats de culture primaire d'astrocytes et de cellules neurales progénitrices wild-type ou invalidée pour le récepteur P2X7 (272).

L'étude préliminaire de la voie biochimique a montré que la coupure protéolytique de l'APP, induite par P2X7R, est due à une métalloprotéase différente des ADAM9, 10 et 17 (272).

4.3.2 LES SECRETASES DANS LA COUPURE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE

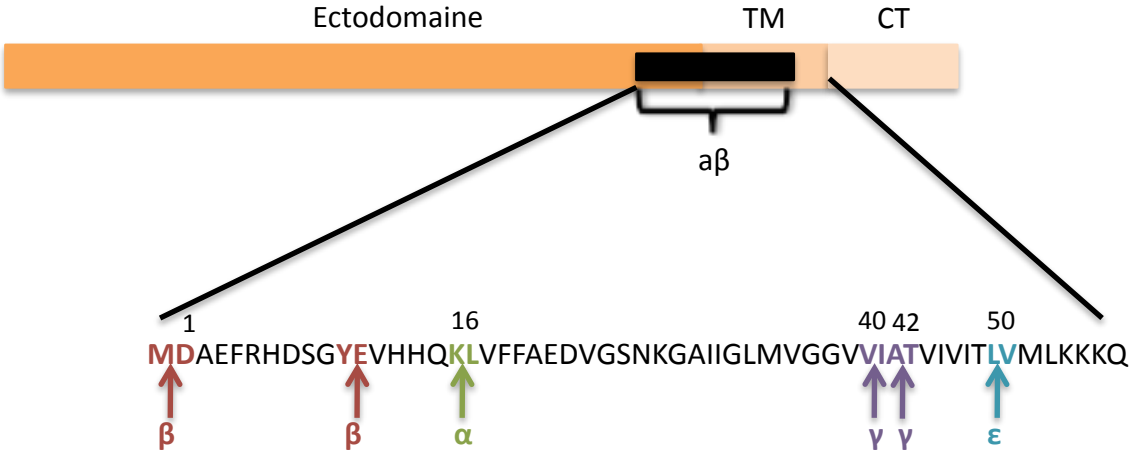


Figure 26 : Sites de coupures de l'APP par les sécrétases (α, β, γ et ε). Modifiée de (274).

4.3.2.1 Sécrétase-α

Les sécrétases-α coupent l'APP entre la lysine16 (K) et la leucine17 (L) du peptide aβ. La coupure en α s'oppose à la production du peptide toxique (Figure 26).

Trois sécrétases-α appartenant à la famille des métalloprotéases de type ADAM ont été identifiées : ADAM9, ADAM10 et ADAM17 (275, 276) (Cf partie III).

Des études *in vivo* ont démontré qu'ADAM10 est la principale sécrétase impliquée dans la coupure non amyloïdogénique de l'APP. Dans un modèle murin de MA, la surexpression d'ADAM10 aboutit à une diminution de la charge amyloïde et à une augmentation de la libération du fragment neuroprotecteur sAPPα. A l'inverse, dans ce modèle double transgénique dans lequel ADAM10 n'est plus fonctionnelle, les auteurs ont constaté une augmentation et une formation plus précoce des plaques amyloïdes que chez les contrôles (230). Ainsi, ADAM10 pourrait être une cible thérapeutique potentielle. Cependant, la stimulation de l'activité ADAM pourrait entraîner d'importants effets secondaires au vu des nombreux substrats d'ADAM10 tels que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα (277) ou la molécule NOTCH. D'autres études ont suggéré qu'ADAM9 pourrait jouer le rôle de sécrétase-α (278 , 279). Cependant, il semblerait qu'ADAM9 soit finalement responsable de l'activation d'ADAM10 (280).

D'autres enzymes de la famille des métalloprotéases pourrait être impliquées dans la coupure

au site α de l'APP. L'activation de la voie non amyloïdogénique par le récepteur P2X7 fait intervenir une métalloprotéase différente des ADAM9, 10 et 17 (272).

4.3.2.2 Sécrétase -β

La production du peptide aβ est dépendante de la coupure en NH_2 terminal de l'APP par une sécrétase-β. En 1999, cinq équipes ont découvert et cloné une aspartyl protéase responsable de la coupure en β de l'APP (281-285). Cette enzyme fortement exprimée dans les neurones (286) a été nommé BACE1 pour Beta site APP Cleaving Enzyme (aussi appelée memapsin-2 ou Asp2). BACE1 est synthétisée sous forme d'un précurseur immature, ProBACE1, qui requiert une glycosylation, une phosphorylation et la coupure du peptide signal par une endopeptidase de type furine afin de produire une enzyme mature (287, 288).

BACE1 coupe l'APP en deux sites distincts : (1) au niveau de l'acide aspartique 1 aboutissant à la libération des peptides amyloïdes majoritaire aβ1-40/42 ; (2) ou au niveau du glutamate 11 donnant les peptides aβ11-40/42 (286) (Figure 26).

BACE1 a une activité optimale dans un environnement acide. Ainsi, il n'a pas été surprenant d'observer sa forte expression dans le cis/trans golgi et dans les endosomes précoces et tardifs (289, 290). Néanmoins, cette enzyme est également localisée à la surface des cellules.

In vivo, des souris invalidées pour le gène BACE1 semblaient présenter un phénotype « normal ». En outre, cette déficience entraînait l'abolition quasi complète de la production des peptides toxiques aβ40 et 42 suggérant que BACE1 pourrait être une cible thérapeutique (291). Cependant, des études plus récentes ont révélé que ces souris développent une hypomyélinisation des nerfs périphériques (292), attribuée à la diminution de la coupure et de l'activation de la neuréguline, un substrat de BACE1 ainsi que des troubles comportementaux s'apparentant à la schizophrénie (293).

En 2009, une nouvelle sécrétase-β présentant une forte homologie avec BACE1 a été caractérisée. Cette enzyme nommée BACE2 est très peu exprimée au niveau cérébral et n'aurait finalement qu'un rôle mineur dans la production des peptides aβ (294).

4.3.2.3 Sécrétase-γ

Ces dernières années, des approches biochimiques et génétiques ont permis de caractériser le complexe mutiprotéique sécrétase-γ. Dans la forme familiale de la MA, 70% des cas présentent des mutations de certaines protéines de la sécrétase-γ.

Ce complexe nécessite quatre protéines pour être fonctionel :

- Préséniline (PS1 ou PS2) compte 8 segments transmembranaires et possède l'activité aspartyl protéase du complexe.
- Nicastrine est une protéine de type I fortement glycosylée, essentielle à l'assemblage du complexe enzymatique.
- Anterior pharynx defective (Aph1) est une protéine à sept passages transmembranaires. Il existe deux gènes homologues Aph1a et Aph1b respectivement localisés sur le chromosome 1 et 15. Aph1 favorise la stabilisation du complexe.
- Préséniline enhancer 2 (Pen2) est une protéine à deux passages transmembranaires qui est indispensable à l'activation de la préséniline (295).

Au niveau cellulaire, la sécrétase-γ est localisée dans le RE, l'AG, les endosomes et dans la membrane plasmique des cellules. Ce complexe présente la particularité de cliver les substrats dans la portion transmembranaire, c'est à dire dans un environnement hydrophobe.

La sécrétase-γ intervient dans la coupure protéolytique de nombreuses molécules transmembranaires telles que Notch et l'APP. A ce jour, deux sites de coupure par la sécrétase-γ ont été identifiés sur l'APP. Son action catalytique engendre la libération des fragments Aβx-40 et AICD59 si la coupure à lieu en position γ ou des peptides Aβx-42 et AICD57 pour un clivage au site γ'. Les raisons pour lesquelles la sécrétase-γ agit en position γ ou γ' n'ont pas encore été élucidées bien que plusieurs hypothèses aient été proposées. En effet, la coupure en γ ou en γ' pourraient dépendre de la localisation de la sécrétase et plus exactement de l'épaisseur de la membrane dans laquelle celle-ci se situe ou à l'hétérogénéité moléculaire du complexe. En faveur de ces hypothèses, Hartmann et Coll. ont observé dans les neurones que la production a lieu dans le trans-Golgi pour les peptides aβ40 et dans le RE pour les peptides aβ42 (296). Plus récemment, Serneels et Coll. ont démontré l'importance du type de molécule Aph1 constituant le complexe. L'inactivation spécifique des complexes sécrétase-γ contenant la molécule Aph1a affecte la coupure de l'APP et de Notch (297) tandis que l'invalidation de la protéine Aph1b diminue la libération des peptides aβ sans altérer les fonctions de Notch dans un modèle murin de la MA (298).

4.3.2.4 Sécrétase-ε

Un nouveau site de clivage situé en aval des sites de la sécrétase-γ a été décrit. Cette coupure a lieu également dans la portion membranaire et libère les fragments aβ50 et AICD50. La nature de l'enzyme responsable de cette activité protéolytique est encore très discutée. Cependant, il est fort probable que cette coupure soit due à une activité sécrétase-γ dépendante des présénilines (274, 299 , 300).

4.3.3 PRODUITS ISSUS DU CATABOLISME DE L'APP

4.3.3.1 Les Peptides amyloïdes

4.3.3.1.1 Origine des peptides aβ

Le peptide amyloïde β (aβ) est un fragment de 4kDa qui constitue les dépôts amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Il est généré par le clivage successif de l'APP par BACE1 (ou BACE 2) puis par une sécrétase-γ. La coupure par ces enzymes peut avoir lieu en différents sites entraînant la libération de peptides aβ de taille variable. Ces peptides ont des propriétés physiques différentes et certains vont s'agréger pour former des oligomères, puis des fibrilles qui seront à l'origine des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer.

4.3.3.1.2 Les différents peptides amyloïdes

L'action de la β puis de la sécrétase-γ conduit à la formation de peptides aβ de taille variable ayant une hétérogénéité en NH2 et COOH terminale.

Il existe deux formes majoritaires de peptides :

- La forme courte aβ1-40 qui s'agrège lentement et présente une faible toxicité.
- La forme longue aβ1-42 capable de s'agréger rapidement et responsable des effets toxiques.

Physiologiquement, le peptide aβ1-40 est le plus abondant (80 à 90%) suivi du peptide aβ1-42 (5 à 10%). Les patients atteints de la MA présente un déséquilibre du rapport aβ1-42 :aβ1-40. Kuperstein et coll. ont démontré que les rapports aβ1-42 :aβ1-40 (3 :7) et (10 :0) présentent une toxicité importante et rapide en se fixant aux synapses et en inhibant leurs activités. En revanche, les rapports (1 :9) et (0 :10) de aβ1-42 :aβ1-40 ne possèdent pas de propriétés toxiques (301). La toxicité provient des deux derniers résidus hydrophobes (isoleucine et alanine) du peptide aβ1-42 augmentant la vitesse d'agrégation (302).

Les formes tronquées NH_2 terminale sont issues de la coupure au niveau des résidus glutamate 3 (aβ3-X), arginine 5 (aβ5-X) ou glutamate 11 (aβ11-X) de l'APP. Ces différentes formes et plus particulièrement l'aβ3-42 présentent une forte toxicité. L'injection d'aβ3-42 conduit à un déficit d'apprentissage, à des troubles de la mémoire et à une mort par apoptose des neurones (303).

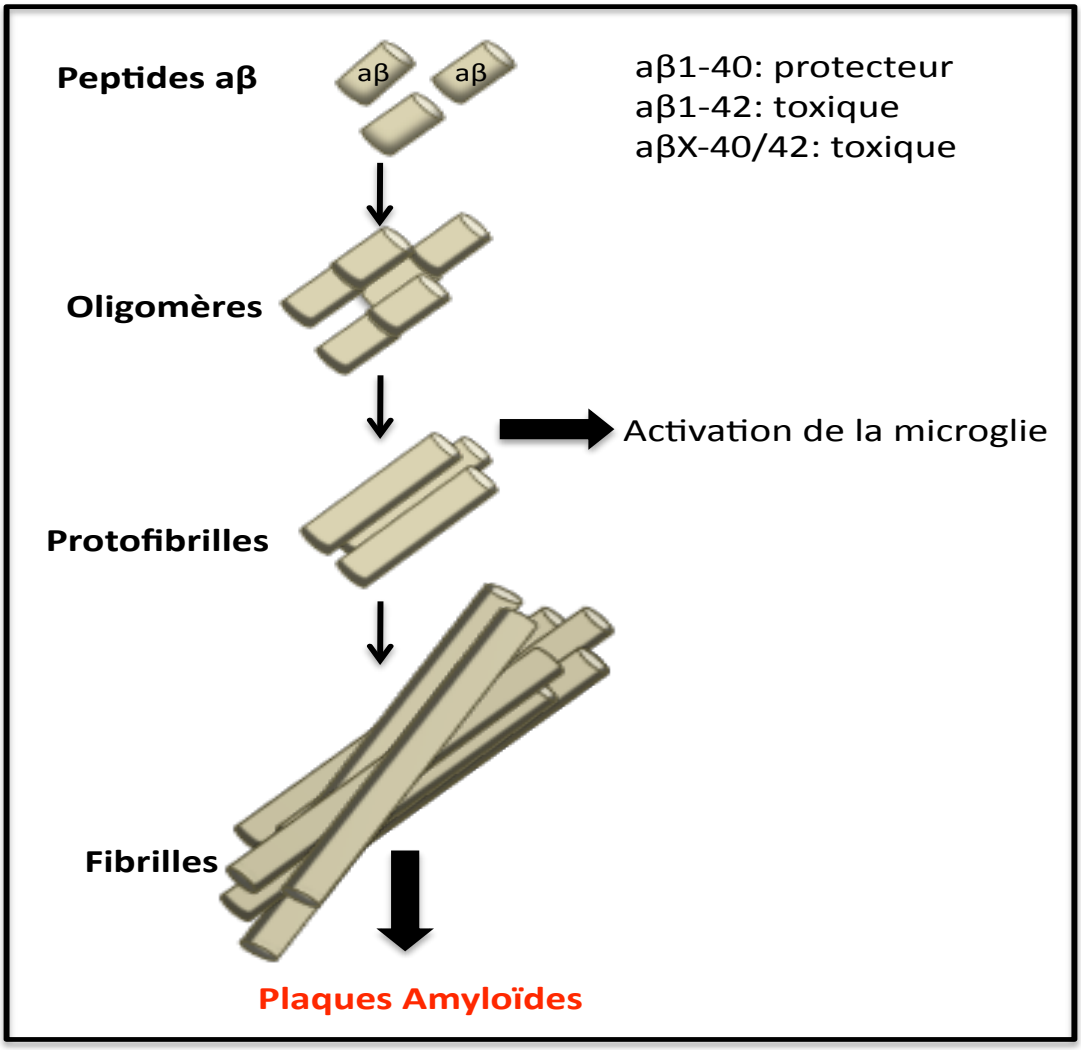


Figure 27 : Etapes de formation des plaques amyloïdes dans la MA.

4.3.3.2 Domaine intracellulaire de l'APP (AICD)

La coupure des fragments α-CTF et β-CTF par la sécrétase-γ libère le peptide AICD long de 57 ou 59 acides aminés.

Le fragment AICD possède plus de 20 partenaires d'interaction notamment impliqué dans la transduction de signaux, l'apoptose et le transport axonal.

De nombreuses études ont montré que l'AICD migre dans le noyau dans lequel il exerce une activité de facteur de transcription. Dans le noyau, son interaction avec la protéine adaptatrice Fe65 et TIP60 agit sur la transcription des gènes codant GSK3β, l'EGF ou encore le suppresseur de tumeur p53 probablement en régulant l'acétylation des histones (pour revue (304)).

4.3.3.3 Propriétés des fragments solubles APPα et APPβ

4.3.3.3.1 Fragment soluble APPβ

Le fragment soluble APPβ est libéré après coupure de l'APP par BACE1. Ce fragment à des effets pro-inflammatoires notamment en activant la microglie et en augmentant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire tel que l'IL-1 (305). D'autre part, des résultats *in vitro* et *in vivo* montrent que le fragment sAPPβ peut être clivé (en position 286 de l'APP770), libérant un fragment de 35 kDa N-APP et un fragment de 55 kDa en absence de facteur trophique. Les auteurs ont observé que le fragment N-APP de 35 kDa lie le récepteur de mort DR6. L'interaction N-APP/DR6 induit une dégénérescence neuronale et axonale dépendante de caspases 3 et 6 (306).

4.3.3.3.2 Fragment soluble APPα

Dans la MA, une des approches thérapeutiques consiste à stimuler la libération du fragment neuroprotecteur et neurotrophique sAPPα. En effet, dans le cerveau sAPPα augmente la synaptogenèse, la croissance des neurones corticaux, la survie cellulaire et améliore la mémoire (Tableau 6) (307 , 308).

Modèle	Effet observé	Référence
Cerveau de rat adulte	Augmentation de la densité synaptique. Amélioration de la mémoire	(307)
Cerveau de souris adulte	Synaptogénèse Augmentation de la densité des boutons présynaptiques	(308)
NPC humain	Différenciation gliale	(309) (310)
Cellule souche mésenchymateuse ; cellule placentaire	Prolifération cellulaire	(311)
Cellule B103 (neuroblastome)	Survie cellulaire	(312)

Tableau 6 : Fonctions du fragment soluble APPα

In vitro, l'inhibition de l'activité sécrétase -α diminue la prolifération des NPC mais celle-ci est rétablie par l'ajout de sAPPα recombinant dans le milieu de culture (311). De plus, l'injection dans des cerveaux de rat adulte du peptide 17-mer (aa 328-332 de l'APP responsable des effets trophiques) augmente la densité synaptique et améliore la mémoire

(307). En 2009, Gralle et Coll. ont proposé que sAPPα favorise la survie cellulaire en fixant l'APP et en empêchant sa dimérisation à la surface des cellules (312).

sAPPα intervient également dans la régulation des acteurs moléculaires de la voie amyloïdogénique en se liant à BACE1. Cette interaction inhibe l'activité catalytique de l'enzyme et aboutit à une nette diminution de la charge amyloïde (313).

Récemment, une étude a démontré que la cycline dependent kinase 5 (CDK5) qui est associée à l'hyperphosphorylation de Tau pourrait être une cible de sAPPα en diminuant son expression dans les neurones corticaux (314).

Néanmoins, les mécanismes moléculaires associés aux propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices de sAPPα restent encore à approfondir.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS

Le récepteur P2X7 est exprimé par différentes cellules du système nerveux dont les astrocytes, les cellules progénitrices neurales et les neurones (79) (projet GENSAT). Dans notre laboratoire, le Dr Delarasse et ses collègues ont démontré que l'activation du récepteur P2X7 induit la coupure non amyloïdogénique du précurseur de la protéine amyloïde et libère le fragment soluble sAPPα, réputé neuroprotecteur. Le même groupe a établi que l'activation des MAPKinases ERK1/2 et JNK était nécessaire à ce clivage. De plus, les travaux du Dr Delarasse ont démontré que la stimulation du P2X7R aboutit à l'activation de métalloprotéases de la famille ADAM. Cependant, dans les cellules du neuroblastome Neuro-2-A, l'ADAM mise en jeu est différente des ADAM9 ,10 et 17, qui sont considérées comme responsables de la coupure en alpha de l'APP (272).

Les objectifs principaux de ma thèse ont été d'analyser les voies biochimiques impliquées dans la coupure de l'APP suite à l'activation du P2X7R. Notre intérêt s'est rapidement porté sur trois protéines: l'Ezrine, la Radixine et la Moesine. Il est établi que les ERM sont impliquées dans le bourgeonnement vésiculaire (blebbing) (186) et que leur activation par phosphorylation dépend d'une Rho-kinase. Or, il est décrit dans la littérature que la stimulation du P2X7R est capable de provoquer l'activation d'une Rho-kinase et d'entraîner un phénomène de bourgeonnement vésiculaire (315). Par ailleurs, différentes études suggèrent que les ERM pourraient jouer un rôle primordial dans la coupure de protéines de surface (CD62L, PSGL-1) (165 , 168, 176). Cependant, aucune étude n'a établi de lien quant au rôle de P2X7 dans l'activation des ERM et à leurs implications dans le clivage de protéines de surface par des sécrétases α.

Dans un premier temps, nous avons analysé les effets de la stimulation du récepteur P2X7 sur l'activation des ERM. Par la suite, nous avons étudié leurs rôles dans le clivage protéolytique de l'APP dépendant de P2X7.

Enfin, nous avons entrepris d'identifier certaines des enzymes intervenant dans cette voie et de les positionner en amont ou en aval de l'activation des ERM.

RESULTATS

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 41, pp. 34583–34595, October 5, 2012
© 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Ezrin/Radixin/Moesin Are Required for the Purinergic P2X7 Receptor (P2X7R)-dependent Processing of the Amyloid Precursor Protein*

Received for publication, July 11, 2012, and in revised form, August 8, 2012 Published, JBC Papers in Press, August 13, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.400010

Amaria Darmellah[‡1,2], **Amel Rayah**[‡1,3], **Rodolphe Auger**[‡], **Marie-Hélène Cuif**[§], **Magali Prigent**[§], **Monique Arpin**[¶], **Andres Alcover**[‖], **Cécile Delarasse**[**4], **and Jean M. Kanellopoulos**[‡5]

From the [‡]*Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619 and* [§]*Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France,* [¶]*Centre de Recherche, Institut Curie, CNRS UMR 144, 75248 Paris, France,* [‖]*Lymphocyte Cell Biology Unit, Department of Immunology, Institut Pasteur, CNRS URA1961, 75015 Paris, France, and* **Centre de Recherche, Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière, INSERM UMRS_975, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), CNRS UMR 7225, 75013 Paris, France*

Background: The purinergic receptor P2X7, an ATP-gated cation channel, triggers the proteolytic cleavage of membrane glycoproteins by α-secretases.
Results: P2X7R induces ezrin, radixin, and moesin (ERM) phosphorylation, which activates the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP).
Conclusion: ERM phosphorylation is required for the P2X7R-dependent release of the neuroprotective fragment of APP.
Significance: ERM can control the non-amyloidogenic processing of APP.

The amyloid precursor protein (APP) can be cleaved by α-secretases in neural cells to produce the soluble APP ectodomain (sAPPα), which is neuroprotective. We have shown previously that activation of the purinergic P2X7 receptor (P2X7R) triggers sAPPα shedding from neural cells. Here, we demonstrate that the activation of ezrin, radixin, and moesin (ERM) proteins is required for the P2X7R-dependent proteolytic processing of APP leading to sAPPα release. Indeed, the down-regulation of ERM by siRNA blocked the P2X7R-dependent shedding of sAPPα. We also show that P2X7R stimulation triggered the phosphorylation of ERM. Thus, ezrin translocates to the plasma membrane to interact with P2X7R. Using specific pharmacological inhibitors, we established the order in which several enzymes trigger the P2X7R-dependent release of sAPPα. Thus, a Rho kinase and the MAPK modules ERK1/2 and JNK act upstream of ERM, whereas a PI3K activity is triggered downstream. For the first time, this work identifies ERM as major partners in the regulated non-amyloidogenic processing of APP.

The amyloid precursor protein (APP)[6] can be processed by three different proteases, α-, β-, and γ-secretases, which are able to cleave APP at different sites (1, 2). The amyloid β peptides produced by β- and γ-secretases are present in senile plaques of patients with Alzheimer disease. In contrast, α-secretases cleave APP within the amyloid β peptide sequence, precluding the formation of neurotoxic peptides and generating the soluble APP ectodomain (sAPPα) endowed with neuroprotective properties (3). Recently, we have demonstrated that P2X7 receptor (P2X7R) stimulation triggers the proteolytic cleavage of APP leading to the shedding of sAPPα from various neural cells (4).

The P2X7R belongs to the P2X receptor family of ATP-gated cation channels. Brief activation of P2X7R with extracellular ATP in its tetra-anionic form, ATP^{4-}, opens cation-specific ion channels. Prolonged ligation of P2X7R results in the formation of non-selective membrane pores permeable to molecules of molecular mass up to 900 Da. Depending on the cell type, P2X7R stimulation triggers different pores that allow cationic and anionic dye uptake in macrophages but only cationic dyes in HEK293 cells (5). Prolonged ATP ligation of P2X7R can lead to membrane blebbing (6) and cell death by apoptosis (7) or lysis/necrosis (8, 9) depending on the cell type. The physiological significance of cell death mediated by P2X7R stimulation remains to be determined. Recent evidence also suggests that P2X7R may in some conditions trigger growth or promote survival (10). Indeed, Adinolfi *et al.* (11) identified a shorter P2X7R natural splice variant lacking the C-terminal region that can heterotrimerize with the longer P2X7R isoform. Their results suggest that if the longer isoform is predominant in the heterotrimer P2X7R will stimulate the non-selective pore opening

* This work was supported in part by the CNRS and Agence Nationale pour la Recherche Grant ANR-07-BLAN-0089-02.
[1] Both authors contributed equally to this work.
[2] Supported by a postdoctoral fellowship from Neuropôle de Recherche Francilien.
[3] Supported by a Ph.D. fellowship from the French government.
[4] Supported by Association France Alzheimer. To whom correspondence may be addressed: CRICM, INSERM UMRS_975, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), CNRS UMR 7225, 75013 Paris, France. E-mail: cecile.delarasse@upmc.fr.
[5] Supported by Association France Alzheimer. To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-1-69-15-46-88; Fax: 33-1-69-85-37-15; E-mail: jean.kanellopoulos@u-psud.fr.
[6] The abbreviations used are: APP, amyloid precursor protein; Ab, antibody; Bz-ATP, benzoylbenzoyl ATP; FERM, band Four point one ezrin, radixin, moesin; ERM, ezrin, radixin, and moesin; EtBr, ethidium bromide; P2X7R, P2X7 receptor; sAPPα, soluble APP ectodomain; MAP, mitogen-activated protein; ANOVA, analysis of variance; NHERF, sodium-hydrogen exchanger regulatory factor; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; DiI, 1,1′-Dioctadecyl-3,3,3′,3′-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate.

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

leading to cell death. In contrast, if the shorter isoform is in excess, P2X7R will trigger cell growth (11).

In addition to its role in cell death/proliferation, numerous physiological functions have been attributed to P2X7R, notably activation of caspase-1 (12, 13), rapid release of mature IL-1β from macrophages (14, 15), and killing of various intracellular pathogens in macrophages (16, 17). Moreover, P2X7R activation triggers the proteolytic cleavage of plasma membrane proteins such as L-selectin, CD23, TNFα, CD27, matrix metalloproteinase-9, and interleukin-6 receptor (18–22).

P2X7R stimulation leads to rapid plasma membrane blebbing (23). Furthermore, it has been shown that ezrin, radixin, and moesin (ERM) are involved in cell cortex rigidity that may control membrane blebbing associated to some cellular processes (24). ERM are considered as key cell cortex organizers, being involved in a variety of major cellular functions like cell shape regulation, cell adhesion and motility, protein subcellular localization, intracellular vesicle traffic, and receptor signal transduction (for reviews, see Refs.25–28). It is currently accepted that ERM can interact with a wide variety of cellular components, including adhesion receptors, ion channels, signaling effectors, and vesicle traffic regulators (28–36). ERM also ensure the interactions between the cortical actin cytoskeleton and microtubule networks (37, 38). ERM proteins link actin filaments to plasma membrane components directly via the cytosolic region of membrane receptors or indirectly through scaffolding proteins bound to transmembrane proteins (26, 39), including substrates for metalloproteases (40). In the cytosol, ERM proteins exist in a closed conformation due to intramolecular interactions between the N- and C-terminal domains masking the membrane and F-actin binding sites (for reviews, see Refs. 26 and 39). Activation of ERM is triggered by sequential binding of the N-terminal domain to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphorylation of a conserved threonine residue (Thr-567 in ezrin) (41). After unfolding, ERM bind to the cytoplasmic domain of numerous transmembrane proteins such as CD44, CD43, L-selectin, and ICAM-2 and link them to F-actin (40). Thus, we determined whether P2X7R stimulation triggers ERM activation and to what extent ERM control P2X7R-mediated cellular functions, including the activation of some plasma membrane proteases.

In the present studies, we demonstrated that P2X7R activation leads to ERM phosphorylation and that these proteins are required for the non-amyloidogenic cleavage of APP. In addition, we found that P2X7R and ERM interact after P2X7R activation. Therefore, ERM are key components in the biochemical pathway leading to sAPPα shedding following P2X7R stimulation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals—Four- to 8-week-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories. P2X7R-deficient mice, backcrossed to C57BL/6 mice for seven generations, were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Reagents and Antibodies—DMEM and DMEM/F-12 were obtained from Invitrogen. ATP and benzoylbenzoyl ATP (Bz-ATP) were from Sigma-Aldrich. Nerve growth factor (NGF) was from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). U0126, U0124, SP600125, fasudil, wortmannin, and LY294002 were from Calbiochem. A438079, a selective antagonist of P2X7R, was obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

The following antibodies (Abs) were used for immunofluorescence and Western blotting: unconjugated mouse monoclonal antibody (mAb) anti-human APP clone 22C11 (Chemicon, Temecula, CA); affinity-purified rabbit anti-P2X7R Abs recognizing residues 576–595 of P2X7R (Alomone Labs); rabbit anti-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Thr(P)-202/Tyr(P)-204), anti-c-Jun N-terminal kinase (JNK)/SAPK (Thr(P)-183/Tyr(P)-185), and rabbit anti-phospho-ERM (Thr-567/Thr-564/Thr-558) antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA); and rabbit anti-ERK1/2, anti-JNK/SAPK, anti-ezrin, and anti-ERM Abs (Cell Signaling Technology). Affinity-purified goat anti-rabbit IgG Abs coupled to peroxidase (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), goat anti-mouse IgG Abs coupled to peroxidase, and mouse mAb anti-goat/sheep IgG conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich) were used as secondary Abs for Western blot analyses, and goat anti-rabbit IgG Abs coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) were used as secondary Abs for immunofluorescence.

Cell Cultures—Neuro2a mouse neuroblastoma cells and HEK293 cells were maintained in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS). Because an excellent mAb capable of detecting human APP and its fragments exists, we have previously transfected Neuro2a cells with a plasmid encoding the V5-tagged human APP cDNA (4). Stable transfectants were cloned and used in the present work. Cultures of newborn astrocytes were prepared from the hemispheres of 1–3-day-old mice. Cells were grown as described previously (4). SK-N-BE human neuroblastoma cells were maintained in DMEM/F-12 containing 10% FCS.

Cell Stimulation—Neuro2a cells were cultured for 48 h in DMEM containing 10% FCS. Medium was then removed, and cells were incubated for 2 h in DMEM at 37 °C. Subsequently, cells were stimulated with 1 mM Bz-ATP or 100 ng/ml NGF for 15 min.

Western Blot Analyses—Proteins from cell lysates or cell supernatants were analyzed as described previously (4). Blots were immunostained with primary Ab at 4 °C overnight and probed with secondary Ab conjugated to horseradish peroxidase. Specific bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Perkin-Elmer Life Sciences). To quantify the extent of phosphorylation of each kinase, the phosphorylated band density was expressed relative to the intensity of the total protein band.

RNA Interference and Plasmid Transfections—Neuro2a cells were stably transfected with the human APP. Small interfering RNAs (siRNAs) targeting mouse ezrin, radixin, and moesin and control siRNA were from Dharmacon (Cramlington, UK). Neuro2a cells were transfected with 1 μM siRNA using Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa, Gaithersburg, MD) as described by the manufacturer. Inhibition of targeted protein was confirmed by Western blot 48 h after transfection. To study ezrin translocation to the plasma membrane, we transfected Neuro2a cells with plasmids containing the cDNA encoding 1) the green fluorescent protein (GFP) pmaxGFP (Lonza), 2) the GFP fused to ezrin, or 3) the GFP fused to the N-terminal FERM domain of ezrin.

Video Microscopy—Cells were observed using a Leica DM IRE2 microscope, and images were captured by a charge-coupled device camera (10-MHz Cool SNAPHQ, Roper Instru-

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

ments). Metamorph software (Universal Imaging Corp.) was used to deconvolute Z-series and treat the images.

Immunofluorescence—Neuro2a cells seeded on polylysine-coated Lab-Tek slides at 2×10^4 cells/well were incubated with Vybrant DiI cell labeling solution (Molecular Probes) for 15 min and stimulated with 1 mM Bz-ATP for 10 min. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, nonspecific sites were blocked using PBS containing 10% BSA, and permeabilization was carried out using 0.1% saponin. Phospho-ERM were detected with rabbit anti-phospho-ERM Abs that were applied for 1 h at room temperature. Cells were then washed three times with PBS, and secondary Ab was applied for 1 h at room temperature. Cells were washed, mounted in Vectashield (Vector Laboratories), and observed with a Zeiss LSM700 microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Duolink® Proximity Ligation in Situ Assay—Cells (4×10^4) were grown on chamber slides in the presence or absence of control siRNA or ERM-specific siRNA. After 48 h, medium was replaced by DMEM containing 0.1% BSA, and cells were stimulated or not with Bz-ATP. Fixation, permeabilization, and incubation with antibodies were performed according to the manufacturer's instructions for Duolink proximity ligation *in situ* assay. The anti-mouse P2X7R rabbit polyclonal Abs were used in association with anti-ezrin mouse mAb or with anti-calcineurin mouse mAb (negative control). The anti-ERM rabbit polyclonal Abs with anti-ezrin mouse mAb were used as a positive control. Fluorescent spots were counted, and the average numbers of spots per cell were calculated using Metamorph software (Universal Imaging Corp.). In the Duolink proximity ligation *in situ* assay, background spots detected with each single Ab were deducted from the numbers of spots found with two Abs specific for different proteins.

Calcium Experiments—Cells were transfected with control siRNA or ERM-specific siRNAs. After 48 h, cells were loaded with 2 μM Fura-2 AM (Molecular probes) in DMEM supplemented with 10% FCS (1 mM Ca^{2+}) for 30 min at 37 °C. Then cells were washed in modified Krebs-HEPES medium and suspended in this buffer. The modified Krebs-HEPES, pH 7.4 contained 128 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.7 mM $CaCl_2$, 16 mM glucose, and 20 mM HEPES. We measured the increase in Ca^{2+} in cells by dual excitation spectrofluorometric analysis at 340 and 380 nm (ratio of A_{340}/A_{380}). Bz-ATP (300 μM) was added after 50 s, and Triton X-100 (0.1%) was added after 200 s.

Non-selective Pore Formation—Cells were transfected with control siRNA or ERM-specific siRNAs, seeded in a flat bottom 96-well plate, and cultured for 48 h. Cells were incubated in assay buffer containing 10 μg/ml ethidium bromide (EtBr) in DMEM containing 0.1% BSA. Bz-ATP (1 mM) was added, and fluorescence was monitored for 20 min at 37 °C in a spectrofluorometer (Wallac 1420) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 615 nm.

Statistical Analysis—Data are expressed as means ± S.E. Data were analyzed using Student's *t* test, and $p < 0.05$ (*) (at least) was considered statistically significant. When data involved more than one variable, statistical significance was estimated with one-way ANOVA followed by Tukey's test using GraphPad software.

RESULTS

P2X7R Specifically Triggers ERM Phosphorylation—It has been shown previously that P2X7R stimulation induces the formation of blebs that are dependent on RhoA-dependent kinase activity (23, 42). Moreover, ERM control cell blebbing associated to some cellular processes (24). Thus, we investigated whether P2X7R stimulation modulates ERM phosphorylation. The levels of phospho-ERM proteins were measured in cell lysates of Neuro2a and Neuro2a-hAPP cells stimulated with 1 mM Bz-ATP, a selective agonist of P2X7R. Interestingly, Bz-ATP stimulation triggered ERM phosphorylation (Fig. 1*A*). The ratio of phospho-ERM *versus* total ezrin was increased 6-fold when Bz-ATP stimulated cells were compared with unstimulated cells (Fig. 1*A*, histograms). A kinetic study of Bz-ATP-induced ERM phosphorylation showed that phosphorylation increased rapidly, reached a maximum at 10–15 min, and decreased to the basal level at 30 min. These data show that Bz-ATP stimulation leads to ERM phosphorylation.

To establish that Bz-ATP induces ERM phosphorylation through P2X7R, we used as a first approach a selective pharmacological inhibitor of P2X7R (A438079). As shown in Fig. 1*A*, Bz-ATP stimulation of Neuro2a cells triggered ERM phosphorylation, whereas preincubation with a 10 μM concentration of the P2X7R inhibitor reduced it to basal levels. Furthermore, Bz-ATP-dependent ezrin and moesin phosphorylation was only observed in HEK cells expressing the mouse P2X7R and not in HEK control cells that did not express P2X7R (Fig. 1*B*). Finally, Bz-ATP stimulation induced ezrin and moesin phosphorylation in primary astrocytes of wild-type animals but not in astrocytes of P2X7R knock-out mice (Fig. 1*C*). In conclusion, these data demonstrate that Bz-ATP triggers ERM phosphorylation via P2X7R.

As human P2X7R has different pharmacological properties from mouse P2X7R, we determined whether P2X7R activation of human cells triggers ERM phosphorylation. Thus, we stimulated human neuroblastoma SK-N-BE cells with Bz-ATP. We found that P2X7R stimulation induces ERM phosphorylation specifically because it was inhibited by the P2X7R pharmacological inhibitor (Fig. 1*D*). Altogether, these results demonstrate that P2X7R stimulation leads to ERM phosphorylation in human and murine cells.

Bz-ATP Stimulation Triggers Ezrin Translocation to the Plasma Membrane—It has previously been established that ERM proteins undergo a major conformational change after phosphorylation and translocate to the plasma membrane (25, 26). Thus, we determined the consequences of P2X7R stimulation on the cellular distribution of ezrin. We stimulated Neuro2a cells expressing ezrin, its N-terminal domain fused to GFP, or GFP alone as a control with Bz-ATP. We followed the fate of GFP proteins by video microscopy. As shown in Fig. 2, 10 min after stimulation with Bz-ATP, ezrin-GFP had translocated to the plasma membrane (compare *C* and *D*), whereas GFP (control) remained cytoplasmic in both cases (Fig. 2, *A* and *B*). As described previously, the N-terminal ezrin-GFP was constitutively localized to the plasma membrane (41) and did not change with Bz-ATP (Fig. 2, *E* and *F*). These results indicate that P2X7R simulation leads to ezrin phosphorylation and to its

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

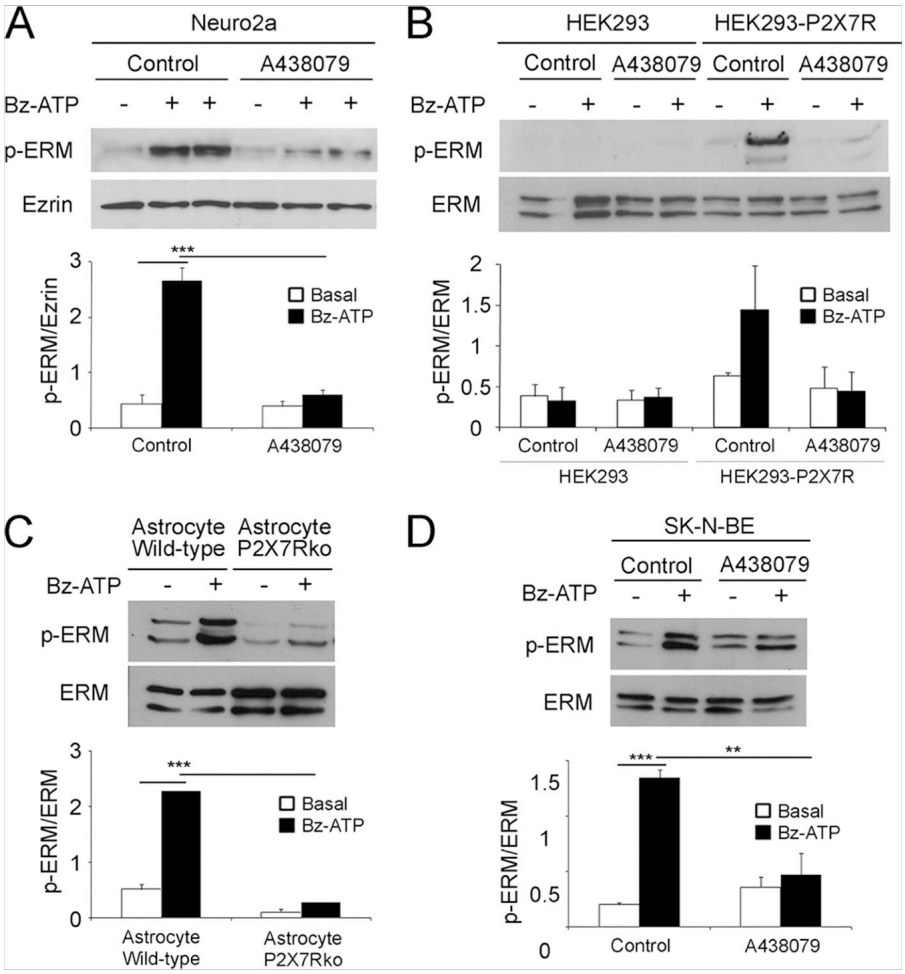


FIGURE 1. **ERM activation is specifically induced by P2X7R stimulation.** *A*, Neuro2a cells were pretreated with or without a pharmacological inhibitor of P2X7R (A438079) at 37 °C for 1 h and stimulated or not with 1 mM Bz-ATP for 10 min. Proteins from whole cell lysates of Neuro2a cells stimulated or not with 1 mM Bz-ATP were separated by SDS-PAGE. After transfer, the nitrocellulose membrane was probed with anti-phosphospecific ERM Abs (*upper panel*). The blot was stripped and probed with anti-ezrin Ab (*lower panel*). Blots were scanned, and the ratios of phosphorylated ERM (*p-ERM*) to total ezrin are presented as histograms. The graph shows the ratios of the phosphorylated ERM *versus* the total ezrin. Data are from four independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 35.73$). *B*, HEK cells or mouse P2X7R stable transfectants of HEK cells were treated as in *A*. Cell lysates were analyzed by Western blot with anti-phosphospecific ERM (*upper* blot) or anti-ERM antibodies (*lower* blot). The graph shows the ratios of the phosphorylated ERM *versus* the total ERM. Data are from three independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 4.18$). *C*, astrocytes from wild-type and P2X7R KO animals were treated or not with 1 mM Bz-ATP at 37 °C for 10 min. Whole cell lysates were analyzed by Western blot with anti-phosphospecific ERM Abs (*upper* blot) and by anti-ERM Abs (*lower* blot). Blots were scanned, and the ratios of phosphorylated ERM *versus* the total ERM are shown as histograms. Data are from three independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 33.95$). *D*, the human neuroblastoma SK-N-BE cells were pretreated with or without A438079 at 37 °C for 1 h and stimulated with or without 1 mM Bz-ATP for 10 min. Whole cell lysates were prepared and analyzed by Western blot using anti-phosphospecific ERM (*upper* blot) or anti-ERM Abs (*lower* blot). Blots were scanned, and the ratios of phosphorylated ERM *versus* the total ERM are shown as histograms. Data are from three independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 23.73$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). *Error bars* represent S.E.

translocation to the plasma membrane. To determine whether P2X7R stimulation leads to translocation of phosphorylated ERM in untransfected cells, we labeled the plasma membrane of Neuro2a cells with DiI, and then these cells were stimulated or not with Bz-ATP and fixed with paraformaldehyde. After permeabilization, cells were labeled with anti-phospho-ERM Abs and analyzed. As shown in Fig. 2, phospho-ERM (*green* labeling) was localized at the plasma membrane (labeled in *red*; *H*), whereas no fluorescence was detected in unstimulated Neuro2a cells (*G*). These experiments establish that Bz-ATP stimulation triggers phosphorylation of ERM and their accumulation under the plasma membrane.

P2X7R Associates with Ezrin—We therefore investigated whether ezrin is capable to associate with P2X7R and whether this interaction is phosphodependent. Thus, the interaction between ezrin and P2X7R was assessed using the Duolink proximity ligation assay. This method relies on the use of two primary antibodies from two different species reacting with ezrin or P2X7R. A pair of oligonucleotide-labeled secondary antibodies is used to detect the bound primary antibodies. If the two different epitopes detected by these antibodies are close enough, the free oligonucleotide extremities are ligated by a DNA ligase, and an amplification reaction is triggered. The amplified products are then visualized with fluorescently labeled oligonucleotides (43). As shown in Fig. 3, each fluorescent spot is produced when the two oligonucleotide-labeled secondary antibodies are in close vicinity. Thus, the number of fluorescent spots/cell indicates that the epitopes detected by the primary antibodies are in close proximity (<25 nm). After P2X7R stimulation, the number of spots/cell increased 5-fold as

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

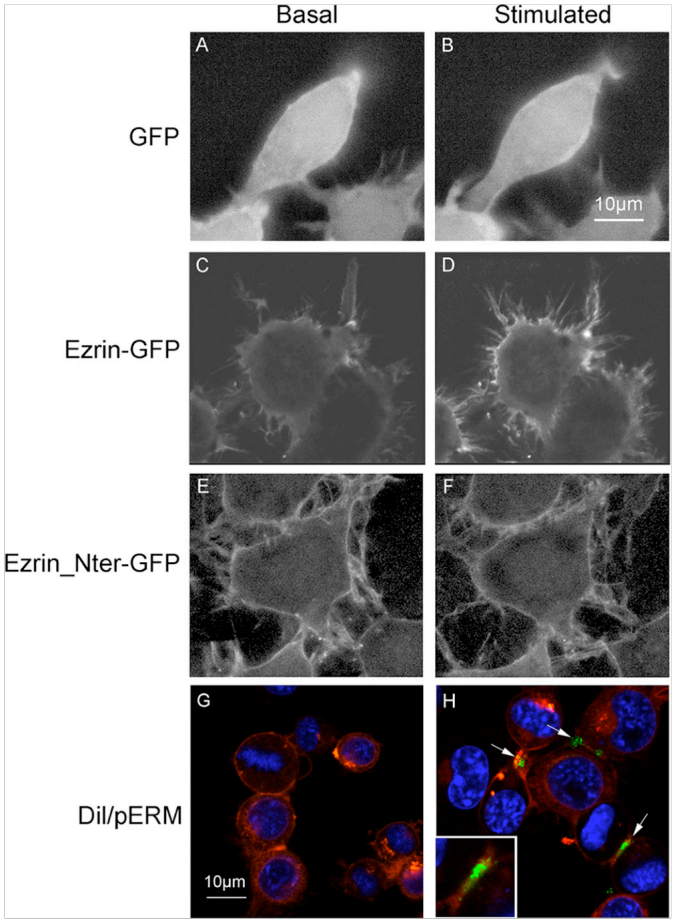


FIGURE 2. **Bz-ATP stimulation induces ezrin translocation to the plasma membrane.** Neuro2a cells were transfected with plasmids expressing GFP (*A* and *B*) or ezrin-GFP (*C* and *D*) or N-terminal domain (*Nter*) of ezrin-GFP (*E* and *F*). Cells were incubated at 37 °C in DMEM and treated with 1 mM Bz-ATP. GFP distribution was assessed by video microscopy. Pictures were taken before addition of Bz-ATP (*A*, *C*, and *E*) and 10 min after stimulation (*B*, *D*, and *F*). Neuro2a-hAPP cells, plated in a polylysine-coated Lab-Tek slide at 2×10^4 cells/well, were incubated with Dil cell labeling solution for 15 min and stimulated (*H*) or not (*G*) with Bz-ATP (1 mM) for 10 min. Fixed and permeabilized cells were labeled with rabbit anti-phosphospecific ERM Abs and then with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (*G* and *H*). *Arrows* show *green* fluorescence corresponding to phosphospecific ERM (*pERM*). The *inset* shows a 2× amplification of the image indicated by the *arrow* in the *right lower quadrant*. The results are representative of four experiments performed on different days.

compared with resting conditions, indicating that P2X7R and ezrin interact (Fig. 3, *A* and *B*). As expected, no interaction was detected between P2X7R and calcineurin (Fig. 3, *A* and *B*).

As shown in Fig. 3, *C* and *D*, the inhibition of ERM expression by ERM-specific siRNAs (Fig. 4*A*) led to a significant decrease in the number of spots/cell, which corresponds to the detection of ERM/ezrin epitopes. Importantly, as shown in Fig. 3, *E* and *F*, the number of fluorescent spots/cell representing P2X7R/ezrin interactions was reduced to background levels when cells were transfected with ERM-specific siRNA, whereas it was not with siRNA control.

ERM Are Not Required for P2X7R-dependent Cation Channel and Non-selective Pore Opening—The activation of P2X7R by extracellular ATP rapidly induces the opening of the cation channel and non-selective pore. Because P2X7R stimulation leads to ERM phosphorylation and increases P2X7R interaction with phospho-ERM, we determined whether ERM are involved in the opening of the cation channel and non-selective pore. As shown in Fig. 4, *B* and *C*, ERM-specific siRNAs did not affect the formations of cation channel, whereas non-selective pore formation was inhibited mildly (24.2 ± 1.6%) even though ERM expression was strongly inhibited (87 ± 4%) (Fig. 4, *A* and *E*). To determine whether the mild decrease in non-selective pore formation is due to a diminution of P2X7R in ERM-deficient cells, we compared the levels of P2X7R in Neuro2a cells transfected with control or ERM-specific siRNAs. As shown in Fig. 4*E*, the amounts of P2X7R were identical in both cell lysates.

ERM Activation Is Required for P2X7R-dependent sAPPα Shedding—We have shown previously that the stimulation of P2X7R triggers the proteolytic cleavage of APP and the release of sAPPα (4). Because we established that P2X7R activation leads to ERM phosphorylation in human and mouse tumor cell lines as well as in primary mouse astrocytes, we determined whether ERM proteins are involved in P2X7R-dependent sAPPα release. To this end, we used siRNAs of ezrin, radixin, and moesin to evaluate their impact on P2X7R-dependent shedding of sAPPα. First, we transfected Neuro2a cells with siRNAs to knock down the three proteins. As shown in Fig. 5*A* (*middle panel*), ezrin, radixin, and moesin expression was inhibited by siRNAs efficiently. In addition, Bz-ATP stimulation induced a strong phosphorylation of ERM in cells transfected with siRNA control, whereas very weak phosphorylated bands appeared in cells transfected with ERM-specific siRNAs (Fig. 5*A*, *upper* blot). We then evaluated the levels of sAPPα released in the supernatants of cells transfected with siRNAs and stimulated or not with Bz-ATP. The data clearly show that the amount of sAPPα released in the supernatant of cells transfected with ERM siRNAs was reduced (by 71.5 ± 5.8%) when compared with control (Fig. 5*B*). Thus, when ERM are knocked down, P2X7R stimulation is unable to trigger APP cleavage. However, one may argue that the expression level of APP is decreased when ERM are knocked out. Thus, we compared the amounts of APP present in Neuro2a cells transfected with control or ERM-specific siRNAs. Identical amounts of surface APP were found in lysates of Neuro2a cells transfected with both siRNAs (data not shown). Because plasma membrane APP represents only 10% of total APP (44), a decrease in cell surface APP might have escaped detection. Thus, we isolated biotinylated cell surface proteins by affinity chromatography with neutravidin beads and compared the amount of membrane APP expressed by Neuro2a cells transfected with siRNAs by Western blot. Our results clearly show that the levels of plasma membrane APP were identical in both cell samples, ruling out that a lack of ERM decreases APP expression and/or localization at the plasma membrane (Fig. 4*E* and data not shown).

The role of each ERM protein in the P2X7R-dependent cleavage of APP was determined using an siRNA specific for each. As observed in Fig. 5, *C*, *E*, and *G*, transfection with siRNA specific for ezrin, radixin, or moesin led to a strong and specific inhibition of the phosphorylated form of each protein. When ezrin and moesin were invalidated, sAPPα shedding was strongly inhibited (for ezrin, 69.7 ± 7.3%; for moesin, 77 ± 1.5%) after P2X7R activation (Fig. 5, *D* and *H*). In contrast, although there was an increased phosphorylation of radixin upon stimulation, a much weaker decrease in sAPPα release

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

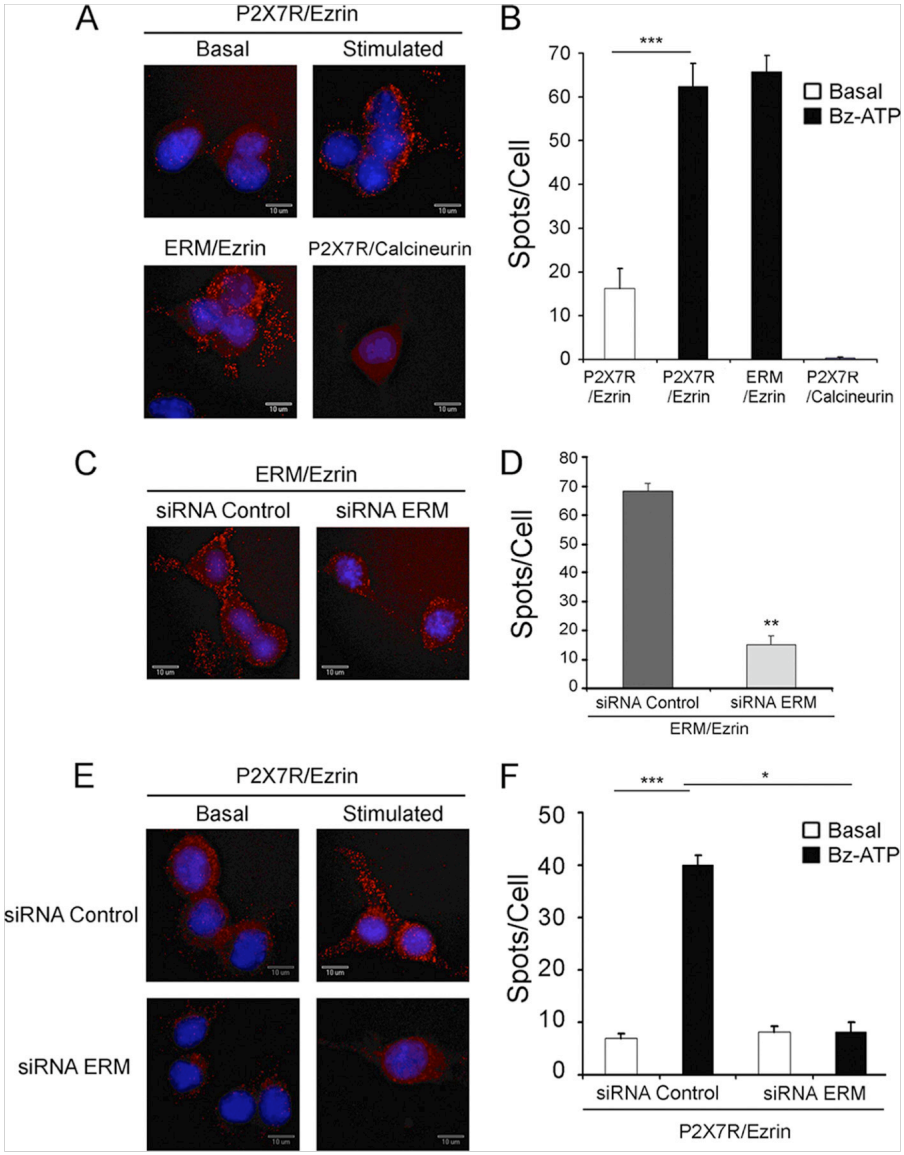


FIGURE 3. **Ezrin interacts with P2X7R.** Neuro2a cells were seeded on Lab-Tek slides and incubated for 48 h at 37 °C. *A*, cells were incubated without *Basal*) or with (*Stimulated*) 1 mM Bz-ATP for 10 min, fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized, and treated with rabbit anti-P2X7R Abs and mouse anti-ezrin mAb (*P2X7R/Ezrin*), with rabbit anti-ERM Abs and mouse anti-ezrin mAb (*ERM/Ezrin*; positive control), or with rabbit anti-P2X7R Abs and mouse anti-calcineurin mAb (*P2X7R/Calcineurin*; negative control). *B*, histograms represent the average values of the number of spots/cell in different fields ±S.E. For each condition, 150–200 cells were analyzed, and one representative experiment of at least three is presented. *C* and *E*, cells were transfected with control or ERM-specific siRNAs for 48 h, then stimulated or not with Bz-ATP for 10 min, fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized, and treated with rabbit anti-ERM Abs and mouse anti-ezrin mAb (*C*) or with rabbit anti-P2X7R Abs and mouse anti-ezrin mAb (*E*). *D* and *F*, histograms represent the average values of the number of spots/cell in different fields ±S.E. For each condition, at least 30 cells were analyzed, and one representative experiment of at least three is presented. The potential interaction of the proteins stained with antibodies was determined using the Duolink technology with two Abs from different species specific for each protein. Each spot indicates that molecules are in close proximity (distance <25 nm). *B*, one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 84$; *D*, Student's *t* test; **, $p < 0.01$; *F*, one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 10.44$; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$. *Error bars* represent S.E.

was observed (36.3 ± 1.9%) when radixin expression was inhibited (Fig. 5*F*). These experiments clearly show that ERM activation is required for the triggering of the proteolytic pathway leading to sAPPα shedding.

ERM Activation Is Not Always Associated with the Induction of sAPPα Shedding—To determine whether any stimulus leading to ERM phosphorylation triggers sAPPα release, we stimulated Neuro2a-hAPP cells with NGF. It is well established that NGF stimulates Neuro2a cells (45) and induces a rapid phosphorylation of ERM (46, 47). Thus, we treated Neuro2a cells with NGF and quantified the ratio of phospho-ERM/ERK (Fig. 6*B*) as well as the percentage of sAPPα released in the supernatants (Fig. 6*C*). The results clearly show that both NGF and Bz-ATP triggered ERM phosphorylation, but Bz-ATP stimulation only led to sAPPα shedding.

Biochemical Pathways Involved in the P2X7R-dependent Proteolytic Processing of APP—It has been established that P2X7R stimulation triggers Rho kinases (23). Thus, we determined whether fasudil, a pharmacological inhibitor of Rho kinase, blocks ERM phosphorylation and sAPPα shedding induced by P2X7R stimulation. As shown in Fig. 7, fasudil efficiently inhibited P2X7R-dependent ERM phosphorylation (Fig. 7*B*) and reduced the shedding of sAPPα to 58.8 ± 1.8% (Fig. 7*A*). Recently, we have demonstrated that the MAPK modules are

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

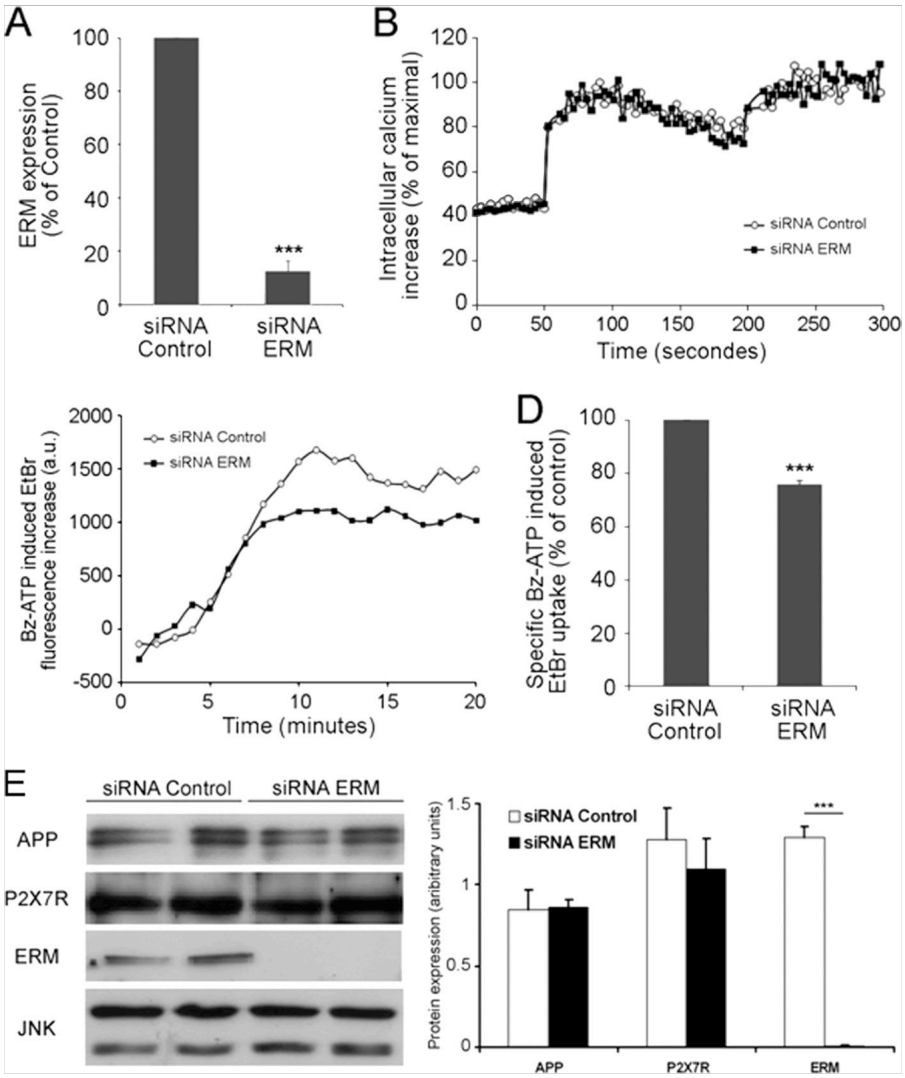


FIGURE 4. **P2X7R-dependent cation channel opening and non-selective pore formation are not or are mildly modulated by ERM, respectively.** *A*, Neuro2a cells were transfected with 3 μM control or ERM-specific siRNAs. After 48 h, cells were lysed, and proteins from cell lysates were analyzed by Western blot with anti-ERM Abs. The amounts of ERM in lysates from cells transfected with control siRNA or ERM-specific siRNAs were quantified. The percentage of inhibition of ERM proteins by specific siRNAs was calculated (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). *B*, Neuro2a cells were loaded with 2 μM Fura-2 AM 48 h after transfection with 3 μM control or ERM siRNAs, cells were stimulated with 300 μM Bz-ATP in modified Krebs-HEPES at 37 °C, and the maximal increase was obtained after addition of 0.1% Triton X-100. The Ca^{2+} increase was determined as described under "Experimental Procedures." *C*, Neuro2a cells were transfected with 3 μM control or ERM-specific siRNAs. After 48 h, cells were incubated with EtBr and stimulated with 1 mM Bz-ATP for increasing lengths of time. EtBr fluorescence of each sample was monitored for 20 min at 37 °C. For each curve, Bz-ATP-dependent EtBr uptake was calculated by subtracting EtBr values of unstimulated cells from values of Bz-ATP-stimulated cells. The results are representative of five experiments performed on different days. *a.u.*, arbitrary units. *D*, the graph shows the percentages of fluorescence obtained after stimulation with Bz-ATP of Neuro2a cells transfected with control or ERM siRNAs. The means of five EtBr fluorescence values at the plateau (from 15 to 20 min) were calculated for control siRNA- and ERM siRNA-transfected cells. The control siRNA values correspond to a 100% fluorescence increase. The percentage of fluorescence obtained in cells transfected with ERM siRNAs was calculated considering fluorescence of control siRNA-transfected cells as 100% (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). *E*, comparison of the amounts of APP and P2X7R present in lysates of Neuro2a cells transfected with control or ERM-specific siRNAs. Neuro2a cells were transfected with 3 μM control or ERM-specific siRNAs. After 48 h, cells were lysed, and proteins from cell lysates were analyzed in duplicate by Western blot with anti-APP, anti-P2X7R, anti-ERM, and anti-JNK Abs. The amounts of each protein were quantified. A comparison of the ratios of the protein levels *versus* JNK in lysates of cells transfected with control or ERM-specific siRNAs is shown in the *right panel*. A significant statistical difference was observed for ERM only (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). *Error bars* represent S.E.

activated after P2X7R stimulation (4). Moreover, the inhibition of the MAP kinases ERK1/2 and JNK but not p38 blocks P2X7R-dependent sAPPα shedding (4). To determine whether these MAPK modules are involved in ERM activation, we assessed the effect of specific pharmacological inhibitors of ERK and JNK on P2X7R-induced ERM activation in Neuro2a cells. We found that both inhibitors blocked ERM phosphorylation (Fig. 7*C*). These experiments demonstrate that the MAP kinases ERK1/2 and JNK are involved in ERM activation. Furthermore, using ERM-specific siRNA, we showed that the inhibition of ERM expression did not block MAP kinase ERK1/2 and JNK phosphorylation (Fig. 7*D*). Altogether, these experiments demonstrate that these Ser/Thr kinases are activated upstream of ERM proteins.

It has been shown previously that P2X7R stimulation of rat astrocytes and mouse thymocytes leads to phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation (8, 48). Furthermore, ezrin has been shown to interact with p85, the regulatory subunit of PI3K (29). Thus, we determined whether PI3K is involved in APP processing and ERM activation. LY294002 (10 μM) and wortmannin

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

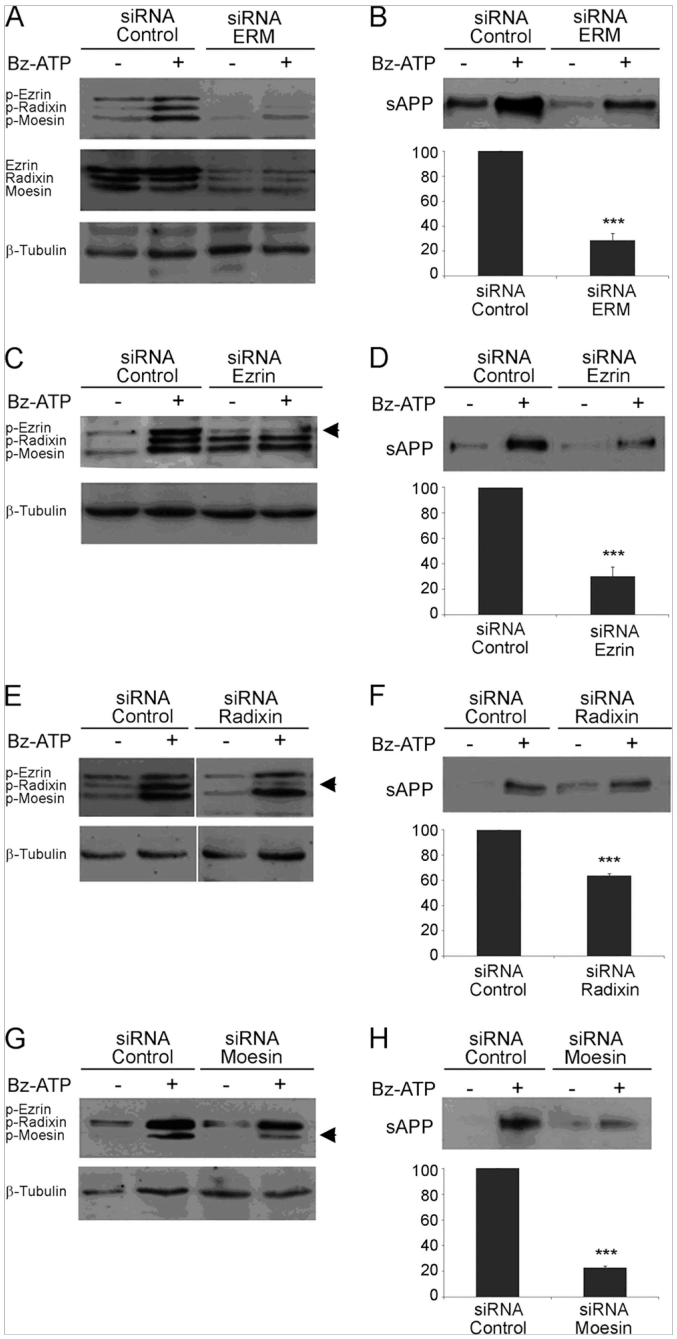


FIGURE 5. **ERM are involved in P2X7R-dependent sAPPα shedding.** *A*, Neuro2a cells were transfected with 3 μM control or ERM siRNAs. After 48 h, cells were stimulated or not with 1 mM Bz-ATP for 10 min. Proteins from cell lysates were analyzed by Western blot with anti-phosphospecific ERM (*A*, *upper* blot) or anti-ERM Abs (*A*, *middle* blot). After stripping, blots were probed with anti-β-tubulin mAb to show equal loading (*A*, *lower* blot). *B*, the supernatants of Neuro2a cells were analyzed for sAPPα shedding by Western blot. The amount of sAPPα released was quantified by densitometric analysis. The amount of sAPPα shed by Neuro2a cells stimulated with Bz-ATP minus the amount of spontaneous sAPPα release corresponds to the maximal amount of sAPPα shed. After siRNA knock-out of ERM, the percentage of sAPPα released corresponds to the quantity of sAPPα shed by stimulated cells minus the amount of spontaneous sAPPα released divided by the maximal amount of sAPPα shed in control conditions. Data are from five independent experiments (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). *C*, *E*, and *G*, Neuro2a cells were transfected by control or ezrin- (*C*), radixin- (*E*), or moesin (*G*)-specific siRNAs. After 48 h, the cells were stimulated or not with 1 mM Bz-ATP. The proteins from cell lysates were analyzed by Western blot using anti-phospho (*p*)-ERM Abs and after stripping with anti-β-tubulin mAb to control for equal loading. *D*, *F*, and *H*, the supernatants from Neuro2a cells described in *C*, *E*, and *G* were analyzed by Western blot to detect the amount of sAPPα released. After siRNA knock-out of each protein, the percentage of sAPPα released, which corresponds to the quantity of sAPPα shed by stimulated cells minus the amount of spontaneous sAPPα divided by the maximal amount of sAPPα shed in control conditions, was calculated. Data are from at least three independent experiments (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). *Error bars* represent S.E.

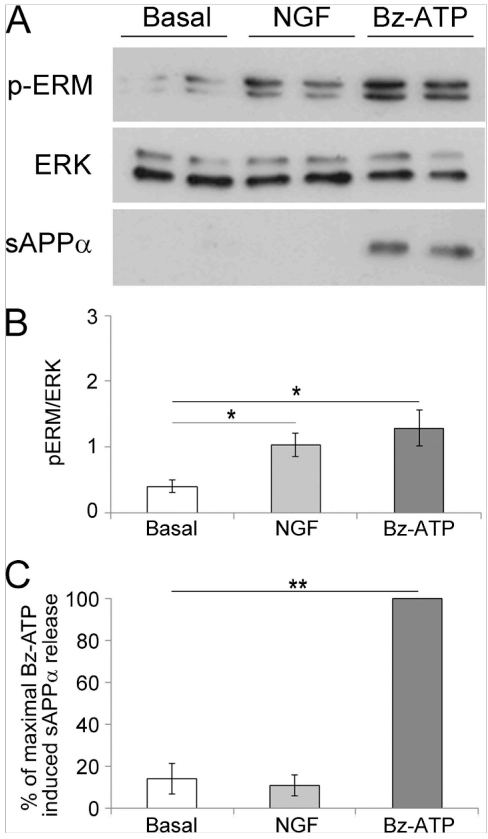


FIGURE 6. **NGF stimulation induces ERM phosphorylation but not sAPPα release.** *A*, Neuro2a cells were stimulated or not with 100 ng/ml NGF or 1 mM Bz-ATP for 15 min. Proteins from whole cell lysates of Neuro2a cells were separated by SDS-PAGE. After transfer, the nitrocellulose membrane was probed with anti-phosphospecific ERM Abs (*upper panel*). The blot was stripped and probed with anti-ERK Abs (*middle panel*). The supernatants of Neuro2a cells were analyzed for sAPPα shedding by Western blot (*lower panel*). *B*, blots were scanned, and the ratios of phosphorylated ERM by ERK are presented as histograms. The graph shows the ratios of the phosphorylated ERM (*pERM*) *versus* ERK. Data are from four independent experiments (Student's *t* test; *, $p < 0.05$). *C*, the amount of sAPPα released was quantified by densitometric analysis. The percentage of sAPPα shed by Neuro2a cells stimulated or not with NGF or Bz-ATP corresponds to the quantity of sAPPα shed divided by the amount of sAPPα released by Bz-ATP-stimulated cells $\times$ 100. Data are from three independent experiments (Student's *t* test; **, $p < 0.01$). *Error bars* represent S.E.

(50 μM), two pharmacological inhibitors of PI3K, strongly decreased sAPP shedding but did not block ERM phosphorylation on threonine (Fig. 7, *E* and *F*). Thus, PI3K is involved in the proteolytic cleavage of APP but acts downstream of ERM activation.

DISCUSSION

In this report, we demonstrate for the first time that ERM protein phosphorylation at Thr-567 and translocation to the membrane is required for the P2X7R-dependent proteolytic processing of APP leading to the shedding of sAPPα. Indeed, we have established that P2X7R stimulation triggers the phosphor-

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

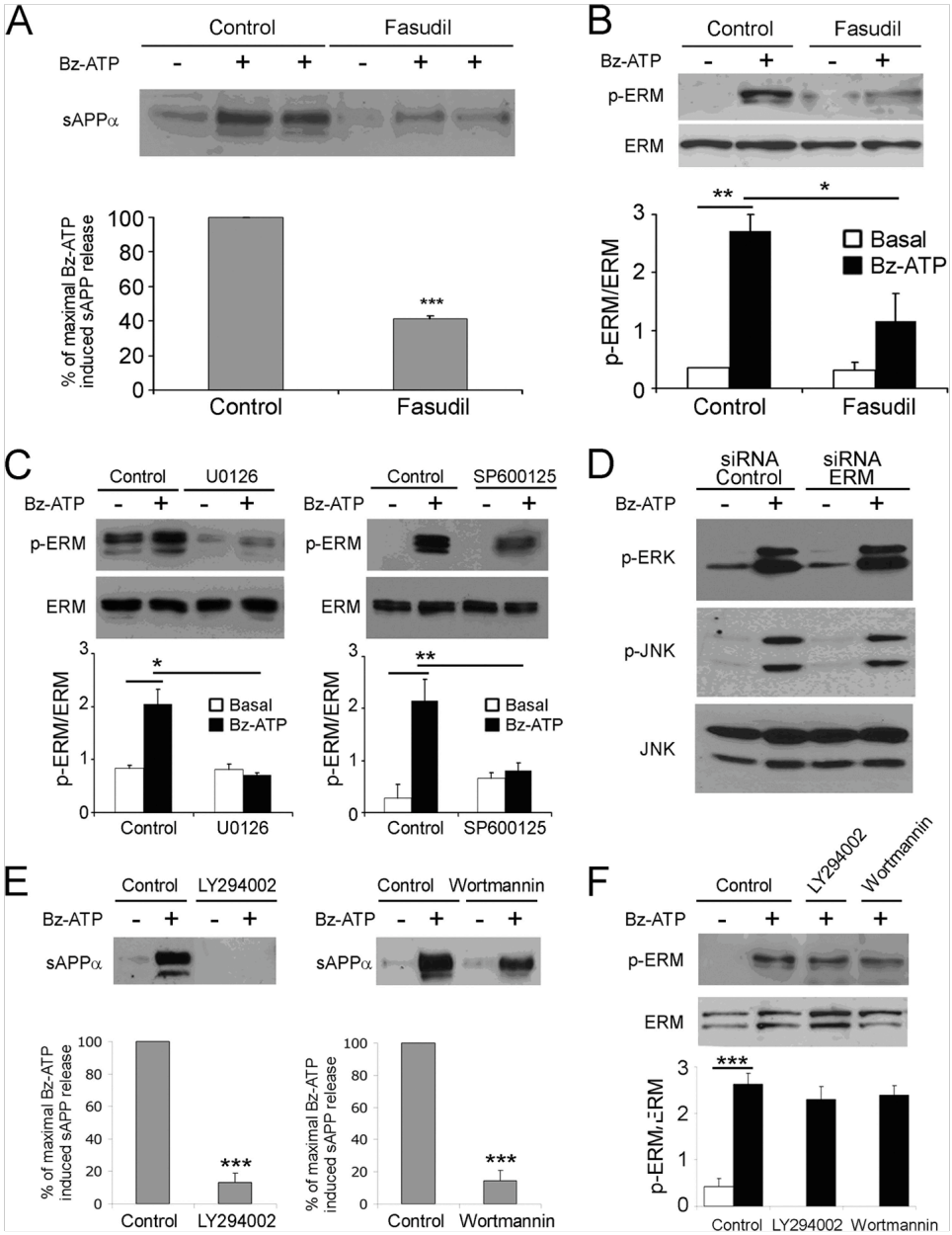


FIGURE 7. **P2X7R-dependent biochemical pathways involved in ERM activation.** *A* and *B*, Neuro2a cells were pretreated with or without 500 nM fasudil, a pharmacological inhibitor of Rho kinases, at 37 °C for 1 h and stimulated with 1 mM Bz-ATP for 10 min. *A*, the supernatants of Neuro2a cells were analyzed for sAPPα shedding by Western blot. Histograms correspond to densitometric analyses of sAPPα release as described under "Experimental Procedures." Values are the means ± S.E. of three independent experiments (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). *B*, cell lysates were analyzed by Western blot with anti-phosphospecific ERM Abs, and then the membrane was stripped and probed with anti-ERM Abs. Blots were scanned, and the ratios of phospho-ERM (*p-ERM*) *versus* total ERM are presented as histograms. Data are from at least three independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 10.70$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). *C*, Neuro2a cells were pretreated or not with 20 μM SP600125, an inhibitor of the MAP kinase JNK; with U0126, an inhibitor of MEK1/2; or with U0124, a negative control for U0126, at 37 °C for 1 h and stimulated with or without 1 mM Bz-ATP for 10 min. Lysates of Neuro2a cells were analyzed by Western blot to detect phospho-ERM (*upper panels*). After stripping, the blots were probed with anti-ERM Abs to show equal loading (*bottom panels*). Histograms represent the amount of phosphorylated ERM *versus* total ERM quantified by densitometric analysis. Data are from at least three independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test; for U0126, $F = 12.44$; for SP600125, $F = 9.13$). *D*, Neuro2a cells were transfected with control or ERM-specific siRNAs. After 48 h, cells were stimulated or not with 1 mM Bz-ATP for 10 min. Cell lysates were analyzed by Western blot with anti-phospho-ERK1/2 (Thr(P)-202/Tyr(P)-204) Abs (*D*, *upper* blot) or with anti-phospho-JNK1/2 (Thr(P)-183/Tyr(P)-185) Abs (*D*, *middle* blot). After stripping, the blot was probed with anti-total JNK1/2 Abs (*F*, lower blot). One representative experiment of at least three is presented. *E*, Neuro2a cells were preincubated at 37 °C with or without 50 μM wortmannin or 10 μM LY294002 for 1 h. Cells were stimulated with 1 mM Bz-ATP at 37 °C for 10 min. Supernatants were analyzed by Western blot to quantify sAPPα. Histograms show the percentages of maximal sAPP release. Data are from three independent experiments (Student's *t* test; ***, $p < 0.001$). In *F*, cell lysates were analyzed to detect phosphorylated ERM (*upper panel*) and total ERM (*lower panel*). The graph shows the ratios of the phosphorylated ERM *versus* the total ERM. Data are from three independent experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $F = 23.53$). *Error bars* represent S.E.

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

ylation of ERM, which translocate to the plasma membrane where they associate with P2X7R. We have shown that the down-regulation of ERM by siRNA blocks the P2X7R-dependent shedding of sAPPα. In addition, using pharmacological inhibitors, we have been able to determine that a Rho kinase and the MAPK modules ERK1/2 and JNK are upstream of ERM proteins, whereas PI3K activity is downstream. Several groups have shown that P2X7R stimulation induces the formation of blebs that are dependent on RhoA-dependent kinase activity (23, 42). Because bleb formation involves ERM proteins (49), we investigated whether P2X7R stimulation induces ERM phosphorylation and determined the consequences of ERM activation. We found that P2X7R stimulation triggered the phosphorylation of a C-terminal threonine in ERM proteins and the shedding of sAPPα. Several candidate ERM kinases have been proposed among which PKC-θ (50), Rho kinase (51), Slik (37), and more recently lymphocyte-oriented kinase in lymphocytes (52). In our studies, we found that the Rho kinase inhibitor fasudil (Fig. 7, *A* and *B*) inhibited ERM phosphorylation and the release of sAPPα following P2X7R stimulation. These results are in agreement with two reports that indicate that P2X7R triggers Rho-A and Rho-A kinase activity in HEK-P2X7R cells, macrophages, and microglial cells (42, 53).

Because ERM phosphorylation is required for the shedding of sAPPα, one can hypothesize that any stimulus triggering ERM phosphorylation should lead to the proteolytic processing of APP and sAPPα release. Thus, we stimulated Neuro2a cells with NGF and showed that this stimulus induced ERM activation without sAPPα production. These results suggest that following ERM phosphorylation the biochemical pathways diverge. Indeed, in most cellular models, P2X7R stimulation leads to cell death, whereas NGF triggers cell growth and survival.

Crystallographic studies have shown that ERM are composed of an N-terminal FERM domain, an α-helical domain, and a C-terminal region that binds F-actin (54). The FERM domain directly interacts with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the cytoplasmic regions of transmembrane glycoproteins such as CD43; CD44; ICAM1, -2, and -3; and the neutral endopeptidase 24.11 (55–60). In addition, the FERM domain binds to the adaptor proteins sodium-hydrogen exchanger regulatory factors NHERF-1 and NHERF-2, also called ERM-binding phosphoprotein of 50 kDa (for a review, see Ref.61). These adaptor proteins interact by their C-terminal domain with ERM and by their PDZ1 domain with C-terminal motifs of several G-protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases (61). Thus, NHERF proteins play a major role in controlling the trafficking and turnover of several membrane receptors and in recruiting enzymes implicated in signal transduction (61, 62).

We have established that P2X7R associates with ERM proteins. A direct interaction of P2X7R with ERM is likely according to our proximity ligation assay, but we cannot rule out that an undefined motif allows the binding to an adaptor protein. Two proteomics studies have identified several proteins associated to P2X7R in P2X7 transfected HEK293 cells (63, 64) and in interferon γ-differentiated human monocytic leukemic THP-1 cells (64). In these studies, ERM were not found among the proteins co-purifying with P2X7R probably because both proteomics analyzes were performed on resting cells and ERM become linked to P2X7R only after stimulation of the receptor.

Our studies have also shown that ERM are not involved in the early biochemical steps of P2X7R activation because cation channel opening was not affected by ERM knockdown, whereas non-selective pore formation was moderately inhibited. In addition, this decrease in pore formation cannot be attributed to a down-modulation of P2X7R because the amounts of P2X7R found in lysates of Neuro2a cells transfected with control siRNA or ERM siRNA were undistinguishable (Fig. 4*E*). Recently, Gu *et al.* (64) have shown that P2X7R is associated with non-muscle myosin II and that ATP triggers the dissociation of P2X7R from myosin II. In addition, decreased expression of myosin II by specific shRNA enhances the non-selective pore formation following P2X7R stimulation. Thus, proteins transiently associated with P2X7R can regulate the non-selective pore formation. Indeed, P2X7R dissociation from non-muscle myosin is required for pore opening, whereas binding of P2X7R to ERM may potentiate this phenomenon.

Activated ERM undergo additional phosphorylation on Tyr-353, which binds PI3K (29). This induces the phosphorylation of Akt/PKB, which phosphorylates several substrates involved in survival pathways. The activation of P2X7R stimulated PI3K activity that was located downstream of ERM (Fig. 7*F*). However, this activity did not trigger the phosphorylation of Akt/PKB in Bz-ATP-treated Neuro2a cells (data not shown), a result in agreement with our previous work on P2X7R-mediated thymocyte death in which PI3K activity does not trigger the pro-survival Akt/PKB pathway (8). Our present data strongly suggest that PI3K participates in the biochemical pathway leading to sAPPα release because wortmannin, a broad spectrum inhibitor of phosphatidylinositol kinases, and a specific PI3K inhibitor prevented the P2X7-dependent processing of APP (Fig. 7*E*). Pretreatment of Neuro2a cells with the PI3K inhibitors did not block ERM phosphorylation on threonine (Fig. 7*F*), indicating that P2X7R signaling in Neuro2a cells leads to ERM phosphorylation via activation of Rho kinase and MAP kinases, whereas PI3K is downstream of ERM. The involvement of PI3K in the shedding of sAPPα was also found when human neuroblastoma SH-SY5Y cells were stimulated with insulin-like growth factor-1 (65, 66). In this model, PI3K activity increased the level of ADAM10, which is involved in the non-amyloidogenic processing of APP (66). However, we have shown previously that the simultaneous silencing of ADAM9, -10, and -17 does not block the P2X7R-mediated proteolytic processing of APP, indicating that an unidentified α-secretase is also triggered by PI3K (4).

Our previous studies have shown that P2X7R stimulation induces a rapid activation of three MAP kinase modules, ERK1/2, JNK, and p38 (4). Importantly, using several pharmacological inhibitors, we have found that inhibition of MAP kinase ERK1/2 and JNK phosphorylation leads to a profound decrease in sAPPα release (4). In the present work, we have established a role, upstream of the ERM proteins, for the MAP kinase ERK1/2 and JNK modules in P2X7R-induced sAPPα shedding because pharmacological inhibition of MAP kinases blocked ERM phosphorylation (Fig. 7*C*), whereas ERM-specific

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

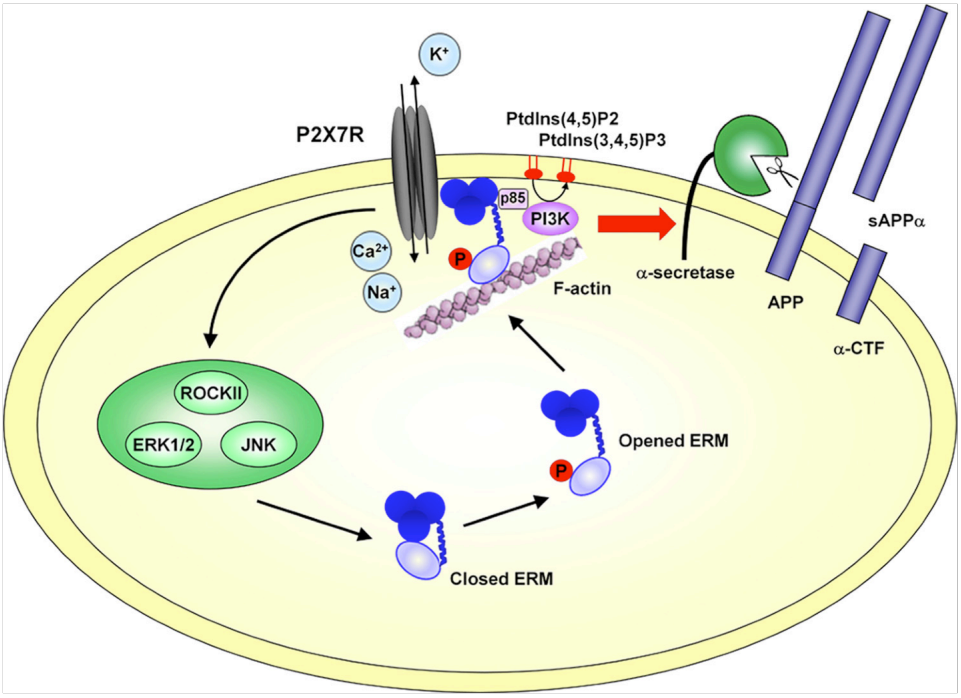


FIGURE 8. **Schematic representation of the biochemical pathways involved in P2X7R-dependent proteolytic cleavage of APP.** P2X7R stimulation by Bz-ATP triggers Ca^{2+} influx and activates the Rho kinase and the MAP kinases ERK1/2 and JNK. These Ser/Thr kinases directly or indirectly phosphorylate the ERM, which in turn translocate at the plasma membrane where they interact with P2X7R. The PI3K activity acts downstream of ERM. We hypothesize that its regulatory subunit is recruited through an SH2 domain to a phosphorylated tyrosine of ezrin as shown by Gautreau *et al.* (29). *PtdIns*, phosphatidylinositol; *ROCKII*, Rho kinase II; *CTF*, C-terminal fragment.

siRNAs did not abolish MAP kinase activation following P2X7R stimulation (Fig. 7*D*).

It is well established that the well known α-secretases ADAM9, -10, and -17 are able to cleave membrane APP to generate the non-amyloidogenic soluble fragment. Kommadi *et al.* (67) have demonstrated that phosphorylation at Thr-735 of ADAM17 is required for p75 neurotrophin receptor cleavage because ADAM17-deficient cells were reconstituted with wild-type ADAM17 but not with ADAM17 T735A mutant protease. In contrast, Le Gall *et al.* (68) have shown recently that the cytoplasmic domain of ADAM17 containing Thr-735 is not required for its activation by several physiological ligands. In addition, although there are Thr and Ser residues, which are potential phosphorylation sites, in the cytoplasmic tails of various ADAMs, to the best of our knowledge up to now, there is no indication that phosphorylation is required for ADAM activation other than ADAM17. In our previous work, we have demonstrated that the P2X7R-mediated sAPPα shedding is due to an unidentified TAPI2-GM6001-sensitive metalloprotease (4). At the present time, it is impossible to predict whether phosphorylation of this α-secretase is involved in its activation or trafficking.

APP can be phosphorylated at Thr-668 in its cytoplasmic region by several kinases such as cyclin-dependent kinase-5, glycogen synthase kinase-3β, and the MAP kinase JNK (69). The physiological role of APP phosphorylation at Thr-668 is controversial. Two studies have suggested it triggered β-secretase processing leading to amyloid β production (70, 71), whereas Feyt *et al.* (72) have found that phosphorylation of APP decreases γ-secretase processing and amyloid β production. Presently, data from the scientific literature suggest that the main consequences of Thr-668 phosphorylation come from a conformational modification that affects APP interactions with adaptor and scaffolding proteins such as Fe65, X11, and JNK-interacting protein 1b (for reviews, see Refs. 69 and 73). In our experimental model, JNK activity is required for ERM activation because pharmacological inhibition of JNK blocked ERM phosphorylation and sAPP shedding (Fig. 7*C*). Thus, in the P2X7R pathway, JNK probably phosphorylates ERM directly or via an undefined kinase, although we cannot rule out that JNK phosphorylates APP as well. ERK1/2 are also needed for ERM activation, so both ERK1/2 and JNK may phosphorylate concomitantly an unidentified kinase specific for the ERM. Alternatively, the two MAP kinases could act sequentially, one of them activating the ERM.

The present study establishes that ERM phosphorylation is required for the P2X7R-dependent non-amyloidogenic processing of APP. Furthermore, using siRNA and pharmacological inhibitors, we have identified the biochemical pathways leading to sAPPα shedding. We have shown that RhoA kinase and the MAP kinases ERK1/2 and JNK are upstream of ERM, whereas PI3K is located downstream (Fig. 8). Thus, complex interactions between transmembrane receptors, ERM, and F-actin may trigger the activation and the possible relocalization of α-secretases as has been observed with G-protein-coupled receptors (74, 75). We hypothesize that ERM are key components in the non-amyloidogenic pathway because they drive the clustering of transmembrane α-secretases with their substrates such as APP.

Acknowledgment—We thank Dr. Sylvain Le Gall for critical review of our manuscript.

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

REFERENCES

1. Gandy, S. (2005) The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Investig.* **115,** 1121–1129
2. Wilquet, V., and De Strooper, B. (2004) Amyloid-β precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14,** 582–588
3. Mattson, M. P. (1997) Cellular actions of β-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* **77,** 1081–1132
4. Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B., and Kanellopoulos, J. M. (2011) The purinergic receptor P2X7 triggers α-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **286,** 2596–2606
5. Schachter, J., Motta, A. P., de Souza Zamorano, A., da Silva-Souza, H. A., Guimarães, M. Z., and Persechini, P. M. (2008) ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J. Cell Sci.* **121,** 3261–3270
6. Wilson, H. L., Wilson, S. A., Surprenant, A., and North, R. A. (2002) Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *J. Biol. Chem.* **277,** 34017–34023
7. Ferrari, D., Los, M., Bauer, M. K., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999) P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* **447,** 71–75
8. Auger, R., Motta, I., Benihoud, K., Ojcius, D. M., and Kanellopoulos, J. M. (2005) A role for mitogen-activated protein kinase (Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J. Biol. Chem.* **280,** 28142–28151
9. Delarasse, C., Gonnord, P., Galante, M., Auger, R., Daniel, H., Motta, I., and Kanellopoulos, J. M. (2009) Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J. Neurochem.* **109,** 846–857
10. Adinolfi, E., Callegari, M. G., Cirillo, M., Pinton, P., Giorgi, C., Cavagna, D., Rizzuto, R., and Di Virgilio, F. (2009) Expression of the P2X7 receptor increases the Ca^{2+} content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J. Biol. Chem.* **284,** 10120–10128
11. Adinolfi, E., Cirillo, M., Woltersdorf, R., Falzoni, S., Chiozzi, P., Pellegatti, P., Callegari, M. G., Sandonà, D., Markwardt, F., Schmalzing, G., and Di Virgilio, F. (2010) Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J.* **24,** 3393–3404
12. Colomar, A., Marty, V., Médina, C., Combe, C., Parnet, P., and Amédée, T. (2003) Maturation and release of interleukin-1β by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* **278,** 30732–30740
13. Kahlenberg, J. M., and Dubyak, G. R. (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K^+ release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286,** C1100–C1108
14. Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., and Gabel, C. A. (2001) Altered cytokine production in mice lacking $P2X_7$ receptors. *J. Biol. Chem.* **276,** 125–132
15. MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., and Surprenant, A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1β by microvesicle shedding. *Immunity* **15,** 825–835
16. Lammas, D. A., Stober, C., Harvey, C. J., Kendrick, N., Panchalingam, S., and Kumararatne, D. S. (1997) ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* **7,** 433–444
17. Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M. N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T., and Ojcius, D. M. (2003) Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* **19,** 403–412
18. Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011) Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J. Biol. Chem.* **286,** 14804–14811
19. Gu, B., Bendall, L. J., and Wiley, J. S. (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92,** 946–951
20. Gu, B. J., and Wiley, J. S. (2006) Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood* **107,** 4946–4953
21. Moon, H., Na, H. Y., Chong, K. H., and Kim, T. J. (2006) P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunol. Lett.* **102,** 98–105
22. Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* **24,** 1–7
23. Morelli, A., Chiozzi, P., Chiesa, A., Ferrari, D., Sanz, J. M., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., Olson, M. F., and Di Virgilio, F. (2003) Extracellular ATP causes ROCK I-dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Mol. Biol. Cell* **14,** 2655–2664
24. Roubinet, C., Decelle, B., Chicanne, G., Dorn, J. F., Payrastre, B., Payre, F., and Carreno, S. (2011) Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J. Cell Biol.* **195,** 99–112
25. Charrin, S., and Alcover, A. (2006) Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Front. Biosci.* **11,** 1987–1997
26. Fiévet, B., Louvard, D., and Arpin, M. (2007) ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773,** 653–660
27. Fehon, R. G., McClatchey, A. I., and Bretscher, A. (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11,** 276–287
28. Arpin, M., Chirivino, D., Naba, A., and Zwaenepoel, I. (2011) Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh. Migr.* **5,** 199–206
29. Gautreau, A., Poullet, P., Louvard, D., and Arpin, M. (1999) Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96,** 7300–7305
30. Chirivino, D., Del Maestro, L., Formstecher, E., Hupé, P., Raposo, G., Louvard, D., and Arpin, M. (2011) The ERM proteins interact with the HOPS complex to regulate the maturation of endosomes. *Mol. Biol. Cell* **22,** 375–385
31. Poullet, P., Gautreau, A., Kadaré, G., Girault, J. A., Louvard, D., and Arpin, M. (2001) Ezrin interacts with focal adhesion kinase and induces its activation independently of cell-matrix adhesion. *J. Biol. Chem.* **276,** 37686–37691
32. Srivastava, J., Elliott, B. E., Louvard, D., and Arpin, M. (2005) Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling. *Mol. Biol. Cell* **16,** 1481–1490
33. Pujuguet, P., Del Maestro, L., Gautreau, A., Louvard, D., and Arpin, M. (2003) Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol. Biol. Cell* **14,** 2181–2191
34. Darmellah, A., Rücker-Martin, C., and Feuvray, D. (2009) ERM proteins mediate the effects of Na^+/H^+ exchanger (NHE1) activation in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **81,** 294–300
35. Killock, D. J., Parsons, M., Zarrouk, M., Ameer-Beg, S. M., Ridley, A. J., Haskard, D. O., Zvelebil, M., and Ivetic, A. (2009) *In vitro* and *in vivo* characterization of molecular interactions between calmodulin, ezrin/radixin/moesin, and L-selectin. *J. Biol. Chem.* **284,** 8833–8845
36. Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1999) Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J. Cell Biol.* **145,** 1497–1509
37. Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E. S., Fuller, M. T., Echard, A., and Payre, F. (2008) Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* **180,** 739–746
38. Lasserre, R., Charrin, S., Cuche, C., Danckaert, A., Thoulouze, M. I., de Chaumont, F., Duong, T., Perrault, N., Varin-Blank, N., Olivo-Marin, J. C., Etienne-Manneville, S., Arpin, M., Di Bartolo, V., and Alcover, A. (2010) Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J.* **29,** 2301–2314
39. Niggli, V., and Rossy, J. (2008) Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40,** 344–349

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

40. Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* **140,** 885–895
41. Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D., and Arpin, M. (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* **164,** 653–659
42. Verhoef, P. A., Estacion, M., Schilling, W., and Dubyak, G. R. (2003) P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1β release. *J. Immunol.* **170,** 5728–5738
43. Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S. M., Ostman, A., and Landegren, U. (2002) Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* **20,** 473–477
44. Thinakaran, G., and Koo, E. H. (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* **283,** 29615–29619
45. Pastor, R., Bernal, J., and Rodríguez-Peña, A. (1994) Unliganded c-erbA/thyroid hormone receptor induces trkB expression in neuroblastoma cells. *Oncogene* **9,** 1081–1089
46. Jeon, S., Park, J. K., Bae, C. D., and Park, J. (2010) NGF-induced moesin phosphorylation is mediated by the PI3K, Rac1 and Akt and required for neurite formation in PC12 cells. *Neurochem. Int.* **56,** 810–818
47. Marsick, B. M., San Miguel-Ruiz, J. E., and Letourneau, P. C. (2012) Activation of ezrin/radixin/moesin mediates attractive growth cone guidance through regulation of growth cone actin and adhesion receptors. *J. Neurosci.* **32,** 282–296
48. Jacques-Silva, M. C., Rodnight, R., Lenz, G., Liao, Z., Kong, Q., Tran, M., Kang, Y., Gonzalez, F. A., Weisman, G. A., and Neary, J. T. (2004) P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **141,** 1106–1117
49. Charras, G. T. (2008) A short history of blebbing. *J. Microsc.* **231,** 466–478
50. Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A., and Elias, L. (1998) Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J. Biol. Chem.* **273,** 7594–7603
51. Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* **140,** 647–657
52. Belkina, N. V., Liu, Y., Hao, J. J., Karasuyama, H., and Shaw, S. (2009) LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106,** 4707–4712
53. Takenouchi, T., Iwamaru, Y., Sugama, S., Sato, M., Hashimoto, M., and Kitani, H. (2008) Lysophospholipids and ATP mutually suppress maturation and release of IL-1β in mouse microglial cells using a Rho-dependent pathway. *J. Immunol.* **180,** 7827–7839
54. Li, Q., Nance, M. R., Kulikauskas, R., Nyberg, K., Fehon, R., Karplus, P. A., Bretscher, A., and Tesmer, J. J. (2007) Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central α-helical domain. *J. Mol. Biol.* **365,** 1446–1459
55. Alonso-Lebrero, J. L., Serrador, J. M., Domínguez-Jiménez, C., Barreiro, O., Luque, A., del Pozo, M. A., Snapp, K., Kansas, G., Schwartz-Albiez, R., Furthmayr, H., Lozano, F., and Sánchez-Madrid, F. (2000) Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood* **95,** 2413–2419
56. Heiska, L., Alfthan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., and Carpén, O. (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273,** 21893–21900
57. Iwase, A., Shen, R., Navarro, D., and Nanus, D. M. (2004) Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of CD44 with ERM proteins. *J. Biol. Chem.* **279,** 11898–11905
58. Mori, T., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., Fukami, Y., and Hakoshima, T. (2008) Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *J. Biol. Chem.* **283,** 29602–29612
59. Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., and Hakoshima, T. (2008) Structural basis of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD43 and its binding to ERM proteins. *J. Mol. Biol.* **381,** 634–644
60. Terawaki, S., Kitano, K., and Hakoshima, T. (2007) Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex. *J. Biol. Chem.* **282,** 19854–19862
61. Weinman, E. J., Hall, R. A., Friedman, P. A., Liu-Chen, L. Y., and Shenolikar, S. (2006) The association of NHERF adaptor proteins with G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **68,** 491–505
62. Voltz, J. W., Weinman, E. J., and Shenolikar, S. (2001) Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene* **20,** 6309–6314
63. Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A., and Surprenant, A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* **20,** 6347–6358
64. Gu, B. J., Saunders, B. M., Jursik, C., and Wiley, J. S. (2010) The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsonized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP. *Blood* **115,** 1621–1631
65. Adlerz, L., Holback, S., Multhaup, G., and Iverfeldt, K. (2007) IGF-1-induced processing of the amyloid precursor protein family is mediated by different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **282,** 10203–10209
66. Jacobsen, K. T., Adlerz, L., Multhaup, G., and Iverfeldt, K. (2010) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-β precursor protein (APP) and APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **285,** 10223–10231
67. Kommaddi, R. P., Thomas, R., Ceni, C., Daigneault, K., and Barker, P. A. (2011) Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J.* **25,** 2061–2070
68. Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D., Niu, X. D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., and Blobel, C. P. (2010) ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell Sci.* **123,** 3913–3922
69. Suzuki, T., and Nakaya, T. (2008) Regulation of amyloid β-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. *J. Biol. Chem.* **283,** 29633–29637
70. Colombo, A., Bastone, A., Ploia, C., Sclip, A., Salmona, M., Forloni, G., and Borsello, T. (2009) JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **33,** 518–525
71. Lee, M. S., Kao, S. C., Lemere, C. A., Xia, W., Tseng, H. C., Zhou, Y., Neve, R., Ahlijanian, M. K., and Tsai, L. H. (2003) APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J. Cell Biol.* **163,** 83–95
72. Feyt, C., Pierrot, N., Tasiaux, B., Van Hees, J., Kienlen-Campard, P., Courtoy, P. J., and Octave, J. N. (2007) Phosphorylation of APP695 at Thr668 decreases γ-cleavage and extracellular Aβ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357,** 1004–1010
73. Schettini, G., Govoni, S., Racchi, M., and Rodriguez, G. (2010) Phosphorylation of APP-CTF-AICD domains and interaction with adaptor proteins: signal transduction and/or transcriptional role—relevance for Alzheimer pathology. *J. Neurochem.* **115,** 1299–1308
74. Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D., and Cotecchia, S. (2006) Ezrin directly interacts with the α_{1b}-adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. *J. Biol. Chem.* **281,** 4354–4363
75. Cant, S. H., and Pitcher, J. A. (2005) G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **16,** 3088–3099

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITE PARIS-SUD 11, on February 25, 2013

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1.IMPLICATION DES ERM DANS LA COUPURE PROTEOLYTIQUE DE L'APP DEPENDANTE DE LA STIMULATION DU P2X7R.

Après fixation de son ligand, le récepteur P2X7 est impliqué dans la coupure de nombreuses protéines. Il peut stimuler la voie de l'inflammasome NALP3 aboutissant à l'activation de la caspase 1, responsable de la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et l'IL-18. La stimulation de ce récepteur est également connue pour activer des sécrétases-α de type ADAM responsables de la coupure protéolytique de nombreuses molécules de surface comme CD62L. Par ailleurs, CD62L et d'autres protéines transmembranaires, également clivées par les ADAM, sont aussi capables d'interagir avec les ERM.

Notre équipe a montré que la stimulation du récepteur P2X7 active une voie biochimique menant à l'activation d'une sécrétase-α et à la libération du fragment sAPPα. Ces résultats ont été validés dans des neuroblastomes humains, murins et sur des cultures primaires d'astrocytes et de cellules progénitrices neurales (316).

Nos résultats indiquent clairement que la stimulation du P2X7R par l'ATP ou le Bz-ATP conduit à l'activation des ERM par phosphorylation et à la liaison de l'ezrine au récepteur. Cette activation des ERM est indispensable à la coupure de l'APP et à la libération du fragment soluble sAPPα.

1.1 Etude de la voie biochimique

Les travaux du Dr Delarasse et coll. ont montré que la stimulation du P2X7R entraîne l'activation des modules de MAPKinases : ERK1/2, JNK et p38 (316). Seuls les inhibiteurs ciblant MEK et JNK diminuent la libération de sAPPα dans les surnageants. Dans ce contexte, nous avons souhaité positionner, dans la voie biochimique, l'activation de ERK et JNK par rapport à la phosphorylation des ERM. L'inhibition pharmacologique de ERK et JNK provoque une inhibition de l'activation des ERM. En revanche, l'inhibition de l'expression des ERM par siARN n'a aucun effet sur la phosphorylation des MAP-Kinases$^{ERK1/2\ et\ JNK}$. Ces résultats indiquent que ERK et JNK agissent en amont de l'activation des ERM (Figure 28). Il serait donc intéressant de déterminer si ces deux sérine-thréonine kinases agissent directement sur les ERM ou si elles activent d'autres cibles de la voie biochimique conduisant à la stimulation des ERM. En effet, l'activation par phosphorylation

de la thréonine en position C-terminale des ERM a été attribuée à de nombreuses kinases (Tableau 3) mais à notre connaissance, pas aux MAPKinases.

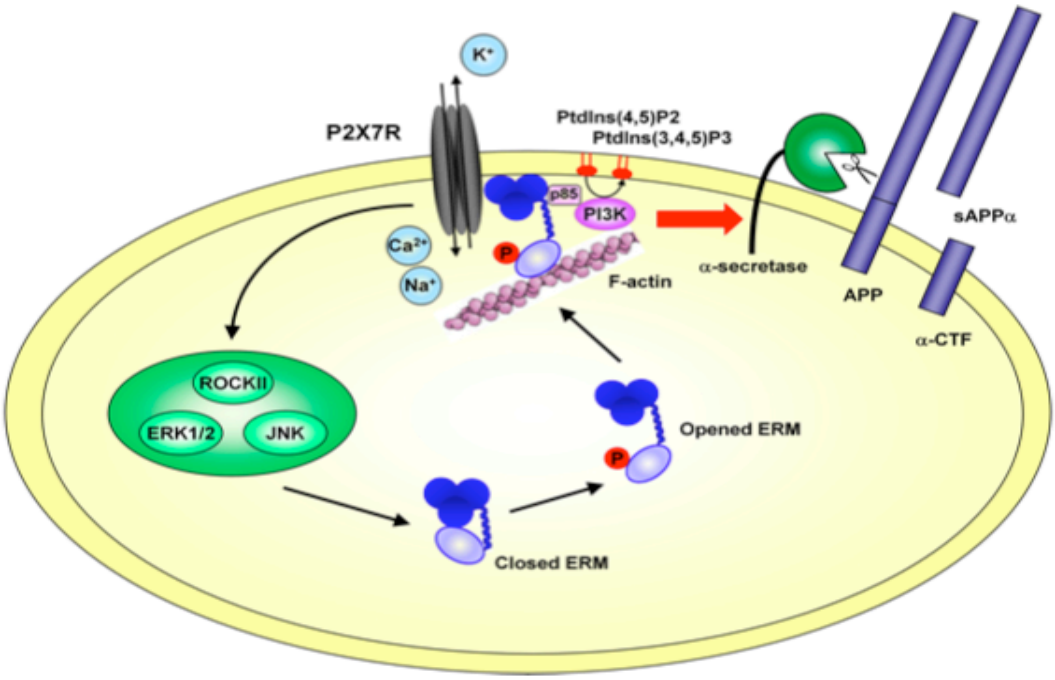


Figure 28 : Représentation schématique de la voie biochimique impliquée dans la coupure de l'APP suite à l'activation du P2X7R.

La stimulation du P2X7R provoque l'activation de la RhoKinase et des MAPKinases ERK1/2 et JNK. Ces sérine/thréonine kinases phosphorylent directement ou indirectement les ERM qui vont migrer à la membrane plasmique et interagir avec le P2X7R aboutissant *in fine* à la coupure en α de l'APP.

La phosphorylation activatrice des ERM est souvent attribuée à une kinase qui est également activée par la stimulation du P2X7 : la Rho-kinase (123). Dans nos travaux, l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique ciblant la Rho-kinase (le fasudil) entraîne une nette diminution de la phosphorylation des ERM et de la coupure neuroprotectrice de l'APP. Ainsi, nos résultats montrent que la stimulation du P2X7R active la Rho-kinase aboutissant à l'activation des ERM. Cependant, on ne peut exclure que la Rho-Kinase agisse en amont de la kinase phosphorylant les ERM, d'autant plus que de nombreux travaux suggèrent fortement que ce n'est pas la Rho-kinase qui les active. En effet, Belkina et coll. ont démontré qu'une kinase, appartenant à la famille des kinases STE est responsable de la phosphorylation des ERM dans les cellules hématopoïétiques (130). Leurs résultats *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'inhibition de la LOKinase réduit fortement la phosphorylation des ERM. Cette étude

renforce des données obtenues précédemment dans lesquelles la kinase SLIK, également de la famille STE, est responsable de la phosphorylation des ERM chez la drosophile. Il serait donc intéressant de déterminer si, dans notre modèle expérimental, une kinase de la famille STE est responsable de l'activation des ERM.

Gautreau et coll. ont montré que la sous-unité catalytique p85 de la PI3K se liait à l'ezrine. Cette interaction fait appel à deux sites distincts de l'ezrine : les 309 acides aminés de la partie N-terminale et de la tyrosine phosphorylée 353 qui s'associe au domaine SH2 de la partie C-terminale de la sous-unité régulatrice p85. L'association des ERM à cette sous-unité relaye l'activation de la voie Akt/PKB et favorise la survie cellulaire dans les cellules épithéliales LLC-PK1 (163).

Dans notre modèle, l'activation du P2X7R stimule l'activité de la PI3K (Figure 28). L'utilisation de la wortmannin, un inhibiteur non spécifique des phosphatidylinositol kinases, et de LY294002, un inhibiteur spécifique des PI3K, montre que celle-ci est nécessaire à la coupure de l'APP. En revanche, l'utilisation de ces inhibiteurs n'a pas d'effet sur la phosphorylation des ERM.

La PI3K agit donc en aval des ERM. L'activité de la PI3K n'induit pas la phosphorylation d'Akt et ne semble donc pas activer une voie de survie. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment, dans notre équipe, sur le rôle de la PI3K dans la mort nécrotique des thymocytes après stimulation du P2X7R (78). En effet, dans la cascade enzymatique déclenchée par P2X7R dans les thymocytes de souris, l'activation de la PI3K n'aboutit pas à une phosphorylation d'Akt (78). De plus, l'inhibition de l'activité mToR (mammalian target of Rapamycin) par la Rapamycine ne bloque pas la voie de mort stimulée par la PI3K (78), montrant ainsi que la voie biochimique mise en jeu est différente de la voie de survie cellulaire stimulée par Akt et son substrat mToR.

Il existe un autre modèle expérimental dans lequel la PI3K, activée, intervient dans la voie biochimique aboutissant au clivage de l'APP et à la libération de sAPPα (Figure 29). Kojro et coll. (267) ont montré que le récepteur couplé aux protéines G, PAC1, stimulé par le peptide neuropituitaire activateur de l'adénylate cyclase (PACAP) provoque une activation des sécrétases-α entraînant la coupure non amyloïdogénique de l'APP (267). L'étude des voies biochimiques mises en jeu montre que la voie dépendante de l'AMP-cyclique et de la PKA n'intervient pas dans le clivage de l'APP et que la PKC y joue un rôle modéré. Par contre, l'activation des MAP-kinases Erk1/2 est indispensable à l'activation des ADAM et au clivage de l'APP (267). De plus, il a été clairement démontré que la PI3Kinase est fortement activée

et que son inhibition abolit l'activation du module de MAP-kinase$^{Erk1/2}$ et la libération de sAPPα (Figure 29) (267). On voit donc que, dans ce modèle expérimental, l'activité PI3kinase est en amont des MAP-kinases Erk1/2, alors que dans notre modèle elle est située en aval des MAP-Kinases Erk1/2. Il est donc clair que l'activité PI3K indispensable à la stimulation de la protéolyse par les ADAM dans les deux modèles n'agit probablement pas sur les mêmes cibles moléculaires.

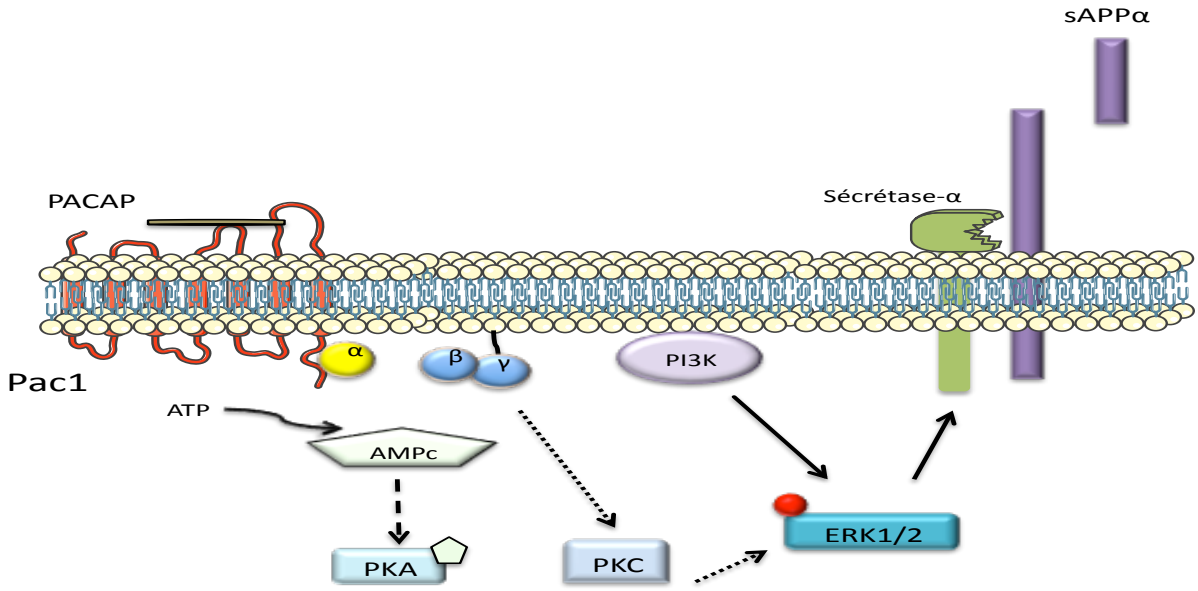


Figure 29 : Représentation schématique de la voie biochimique aboutissant à la libération du fragment sAPPα, suite à la stimulation du récepteur PAC1 par son ligand PACAP.

1.2 Une nouvelle métalloprotéase à l'origine de la coupure de l'APP par P2X7.

Les métalloprotéases décrites dans la coupure non amyloïdogénique de l'APP sont ADAM9, 10 et 17. Les recherches actuelles suggèrent fortement que c'est ADAM10, la principale protéase impliquée dans la coupure de l'APP. En effet, comme l'a démontré Postina et coll. dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, la surexpression d'ADAM10 entraîne à la fois une diminution des plaques amyloïdes et des déficits neurologiques. *In vivo*, cette protéase permet la libération du fragment neuroprotecteur sAPPα (230). De plus, Suh et coll.

(317) ont identifié deux mutations rares dans le prodomaine d'ADAM10 qui sont associées à la forme tardive de la maladie d'Alzheimer. Afin d'étudier le rôle de ces deux mutations, ces auteurs ont produits des souris transgéniques qui expriment chacune des formes humaines mutées. Leurs travaux montrent que l'activité sécretase-α des ADAM10 mutées est réduite, que la coupure protéolytique de l'APP est déplacée vers les formes amyloïdogéniques Aβ et que la neurogénèse dans l'hippocampe adulte est fortement réduite en comparaison avec celle des souris contrôles (317). L'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que c'est ADAM10 qui est la sécrétase-α physiologique de l'APP *in vivo*. Par ailleurs, Kuhn et coll. ont étudié la coupure protéolytique de l'APP dans des cultures de neurones primaires de souris. Ils ont démontré de façon très convaincante que la sécrétase-α physiologique, capable de libérer sAPPα est ADAM10. En absence d'ADAM10, les ADAM9 et 17 ne peuvent pas la remplacer. Ce résultat est intéressant car les ADAM10 et 17 ont des spécificités très larges et il a été démontré par Le Gall et coll. qu'il existe une compensation entre ces deux ADAM (228). De ce fait, la spécificité très nette observée dans les neurones suggère qu'il existe des facteurs encore inconnus qui contrôlent la spécificité de la protéase dans un type cellulaire donné. En effet, dans des fibroblastes murins issus de souris invalidées pour ADAM10, la stimulation par le PMA entraîne la libération du fragment sAPPα. Ces résultats indiquent qu'une autre protéase peut remplacer ADAM10 dans des cellules différentes des neurones.

Dans un modèle de neuroblastome murin, l'utilisation de siARN ciblant plusieurs de ces ADAM ont montré que la libération de sAPPα après activation du P2X7R est indépendante des ADAM 9, 10 et 17. Cependant, les inhibiteurs pharmacologiques (TAPI-2 et GM-6001) ciblant les métalloprotéases, inhibent très efficacement la libération de sAPPα après activation du P2X7R. Ces expériences suggèrent que des ADAM ou des MMP sont responsables de cette coupure. Ainsi, la stimulation du P2X7R aboutirait à l'activation d'une ADAM/MMP non identifiée. Cependant, on ne peut exclure que l'inhibition partielle par siARN des ADAM 9, 10 et 17 laisse une quantité infime mais suffisante de protéase pour induire cette coupure de l'APP. Afin de démontrer que dans notre modèle les ADAM10 et 17 ne jouent aucun rôle dans le clivage de l'APP, nous avons obtenus des lignées de fibroblastes embryonnaires de souris contrôles, invalidées pour ADAM10, ADAM17 et ADAM10 et 17. A partir de ces différents fibroblastes, nous avons produit des clones stables transfectés par le P2X7R. Dans ces lignées transfectées par le plasmide codant l'APP, nous pourrons déterminer si la stimulation du P2X7R provoque le clivage de l'APP en totale absence d'ADAM10 et 17.

1.3 Interaction P2X7R/Ezrine

Nous avons démontré que l'ezrine et la moesine étaient activées après stimulation du P2X7R par le Bz-ATP. La phosphorylation activatrice de la thréonine 567 de l'ezrine entraîne sa translocation du cytoplasme à la membrane plasmique où elle se lie au P2X7R.

1.3.1 Site de fixation P2X7R/Ezrine

a) Liaison directe

Les ERM interagissent directement avec de nombreuses protéines membranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire telles que les ICAM et CD44. L'analyse des sites de fixation reconnus par les ERM ne permet pas d'identifier une séquence consensus. Cependant, les différentes séquences découvertes ainsi que les travaux de Yonemura sur la protéine CD44 démontrent qu'en général la liaison des ERM s'effectue sur des domaines cytosoliques de protéines de surface ayant un pHi basique (Tableau 7) .

Les ERM interagissent avec des régions riches en résidus basiques (156).

Protéines	point isoélectrique	Liaison aux ERM
CD44	8,17	Faible
CD43	9,24	Forte
ICAM2	12,98	Forte
E cadhérine	3,89	Inexistante
Occludine	5,85	Inexistante

Tableau 7 : Point isoélectrique de la région cytoplasmique des différentes protéines de surface. D'après (156).

Domaine C-terminal du P2X7R : pHi 8,68

NTYSSAFCRSGVYPYCKCCEPCTVNEYYYRKKCESIMEPKPTLKYVSFVDEPH
IRMVDQQLLGKSLQVVKGQEVPRPQMDFSDLSRLSLSLHDSPLTPGQSEEIQLL
HEEVAPKSGDSPSWCQCGNCLPSRLPEQRRALEELCCRRKPGRCITTSKLFHK
LVLSRDTLQLLLLYQDPLLVLGEEATNSRLRHRAYRCYATWRFGSQDMADFA
ILPSCCRWRIRKEFPKTEGQYSGFKYPY

Domaines N-terminaux du P2X7R :

Isoforme A : MPACCSWNDVLQYETNKVTRIQSTN pHi : 5,82

Isoforme K : MLPV - - - SHLCSHKSGKVLEIHSIW pHi : 8,02

Figure 30 : Régions cytoplasmiques du P2X7R murin

En rouge les résidus chargés positivement, en bleu les cystéines palmitoylées et surlignés en vert ou jaune les sites de fixation potentiels des ERM aux récepteurs.

Le pHi du domaine cytosolique C-terminal du P2X7R murin est de 8,68 et permet d'envisager différents sites potentiels d'interaction (Figure 30).

L'analyse de ce domaine montre que de nombreux sites basiques sont à proximité des cystéines palmitoylées (65). L'encombrement stérique dû à la palmitoylation permet d'envisager quatre sites d'interaction potentiels (peptides surlignés en vert). Cependant, nous n'avons pas preuve que les ERM interagissent uniquement avec les récepteurs P2X7 palmitoylés, localisés dans les radeaux lipidiques. En effet, à la membrane plasmique, environ 50% seulement des récepteurs P2X7 sont palmitoylés (65 , 316). On pourrait donc inclure aussi deux autres peptides surlignés en jaune qui sont proche des cystéines palmitoylées. Ces peptides deviendraient accessibles aux ERM dans le P2X7R non palmitoylé.

La région intracytoplasmique N-terminale du P2X7R est différente suivant qu'il s'agit de l'isoforme A ou K. Pour l'isoforme A, le pHi est de 5,82, alors que sa valeur est de 8,02 pour

l'isoforme K. L'analyse de la séquence peptidique montre qu'il existe un site potentiel de liaison aux ERM pour chacune des isoformes (surligné en vert) (Figure 30).

Expériences programmées :

Les séquences peptidiques qui pourraient interagir avec le domaine FERM des ERM seront synthétisées et biotinylées en position carboxy-terminale avec un espaceur hydrophile pour permettre une bonne interaction avec la streptavidine. Dans une seconde étape, les peptides biotinylés seront incubés avec les protéines Ezrine-GST et Ezrine tronquée-GST. Ces mélanges seront ensuite filtrés sur billes d'agarose couplées à la streptavidine. Après lavages en tampon physiologique, les éluats des billes seront analysés en western-blot pour détecter la présence ou non d'ezrine. Un contrôle positif important sera utilisé pendant ces expériences, il s'agit du peptide de CD44, SRRRCGQKKKLVINGGNGTV biotinylé, qui est connu pour interagir avec un K_D d'environ 10nM pour l'ezrine et de 120nM pour la radixine.

Si l'on identifie un ou deux peptides capables d'interagir avec l'ezrine, nous pourrons faire synthétiser des peptides mutants dans lesquels les résidus basiques seront remplacés par des alanines. Ces expériences nous permettront de programmer des mutations dans la séquence peptidique du P2X7R interagissant avec l'ezrine. Nous produirons des plasmides contenant la ou les séquences mutées du P2X7R. Ces plasmides seront utilisés pour transfecter la lignée humaine HEK293 qui n'exprime aucun récepteur P2X. Ces transfectants seront ensuite stimulés par l'ATP ou le Bz-ATP et la capacité de ces transfectants à cliver l'APP ou d'autres protéines transmembranaires sera étudiée. Si les transfectants expriment des récepteurs P2X7 fonctionnels capables de stimuler le clivage protéolytique des molécules telles que l'APP, CD62L etc, nous aurons la preuve que la liaison aux ERM du P2X7R n'est pas indispensable à la coupure des substrats membranaires. Cependant, nous devrons nous assurer par des techniques de PLA que les récepteurs mutés n'interagissent pas avec les ERM malgré les mutations effectuées.

Cependant, si aucun des peptides analysés dans la région C-terminale ne lient les ERM, nous étudierons la capacité des peptides N-terminaux du récepteur à fixer les ERM. Les peptides surlignés en vert seront testés comme décrit dans le paragraphe précédent (Figure 30). La fixation des ERM à la région N-terminal du P2X7R provoquerait son ancrage à la F-actine et par voie de conséquence son immobilisation. Cependant, l'étude de l'équipe de Renner (47) est en défaveur de cette hypothèse. En effet, dans des cellules primaires neurales transfectées,

la mutation de la lysine 17 en alanine provoque une diminution de la diffusion des récepteurs P2X7 dans la membrane plasmique même après une stimulation à l'ATP. Ainsi, si ce résidu participait à la liaison aux ERM, nous nous attendrions à observer une augmentation de la mobilité pour ce mutant (47).

b) Liaison indirecte

Il n'est pas exclu que les ERM lient indirectement les parties cytosoliques du P2X7R par l'intermédiaire de protéines adaptatrices car la technique de PLA détecte la proximité de deux protéines à condition qu'elles ne soient pas distantes de plus de 28Å. En effet, l'interaction des ERM avec les protéines membranaires CFTR et NH3 est indirecte et met en jeu des phosphoprotéines à domaines PDZ : EBP50 et NHERF (318). La région C-terminale de ces protéines interagit avec les ERM et leurs domaines PDZ lient la région transmembranaire des glycoprotéines de la membrane plasmique.

Par ailleurs, deux études de protéomique ont identifié de nombreuses protéines interagissant avec le P2X7R dans des cellules HEK et THP-1 (18 , 61). Dans ces études, les ERM ou les protéines adaptatrices n'ont pas été co-immunoprécipitées avec le récepteur (18 , 61). Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par l'absence de toute stimulation du récepteur P2X7 avant co-immunoprécipitation de ce dernier dans l'étude de Kim et coll. (18). Or, la liaison des ERM au récepteur n'a lieu qu'après activation de celui-ci. Par contre, dans leurs travaux Gu et coll. ont stimulé les récepteurs P2X7 par l'ATP avant co-immunoprécipitation et observent la disparition de la myosine II non-musculaire mais pas d'association des ERM confirmant la difficulté rencontrée par tous les groupes à co-immunoprécipiter les ERM avec les protéines qu'elles fixent.

Nos résultats de co-immunoprécitation n'ont pas permis de montrer une interaction entre les ERM et le P2X7R (résultats préliminaires). Cependant, l'absence de co-immunoprécipitation des ERM avec P2X7R pourrait s'expliquer par la difficulté technique rencontrée par la majorité des chercheurs désireux de mettre en évidence une telle interaction. En effet, cela pourrait être dû à la liaison directe du domaine C-ERMAD des ERM à l'actine entraînant une agrégation des complexes et leur précipitation avec cette dernière.

1.4 La liaison des ERM au P2X7R est-elle indispensable à la coupure protéolytique de l'APP ?

L'activation des ERM induit un important réarrangement du cytosquelette en agissant sur le réseau d'actine. L'activation des ERM au niveau de la synapse immunologique favorise le rassemblement de récepteurs T à la jonction cellule T/ cellule présentatrice d'antigènes. L'utilisation du dominant négatif de l'ezrine inhibe l'accumulation, au niveau de la synapse immunologique, de la PKCθ indispensable à la transmission du signal d'activation dans les lymphocytes T. Ainsi, l'ezrine joue un rôle clé dans la formation de micro-agrégats et dans la transmission des signaux (190, 191).

Par ailleurs, de nombreuses protéines de surface coupées par des sécrétases-α interagissent avec les ERM. Ivetic et coll. ont clairement démontré que la moesine et l'ezrine sont associées à la région cytosolique de CD62L (165). Ces travaux indiquent que l'ezrine est liée de façon constitutive tandis que la liaison de la moesine n'a lieu qu'après une stimulation par le PMA. De plus, les mutations des résidus auxquels se lient la moesine, entraînent une nette diminution de la coupure de CD62L par ADAM17 (165).

De plus, Dominguez-Luis et coll ont démontré que les ERM peuvent interagir avec les protéases et les substrats. Par des expériences de co-immunoprécipitation, ils ont observé que les ERM lient la protéine PSGL-1 ainsi que l'ADAM8, responsable du clivage de PSGL-1. Il n'est donc pas exclu que la liaison des ERM puisse se faire au récepteur P2X7 mais également au niveau des sécrétases et de leurs substrats (168).

Dans ce contexte, trois hypothèses sont envisageables (Figure 31) :

(1) Seule la liaison des ERM aux substrats des sécrétases-α est nécessaire au clivage.

(2) Les ERM lient la sécrétase-α et le substrat favorisant leur rapprochement et la coupure du substrat. Alors que la liaison des ERM au P2X7R serait impliquée dans une autre voie biochimique.

(3) Les ERM interagissent avec le P2X7R, la sécrétase α et le substrat et favorisent le regroupement de ces trois protéines.

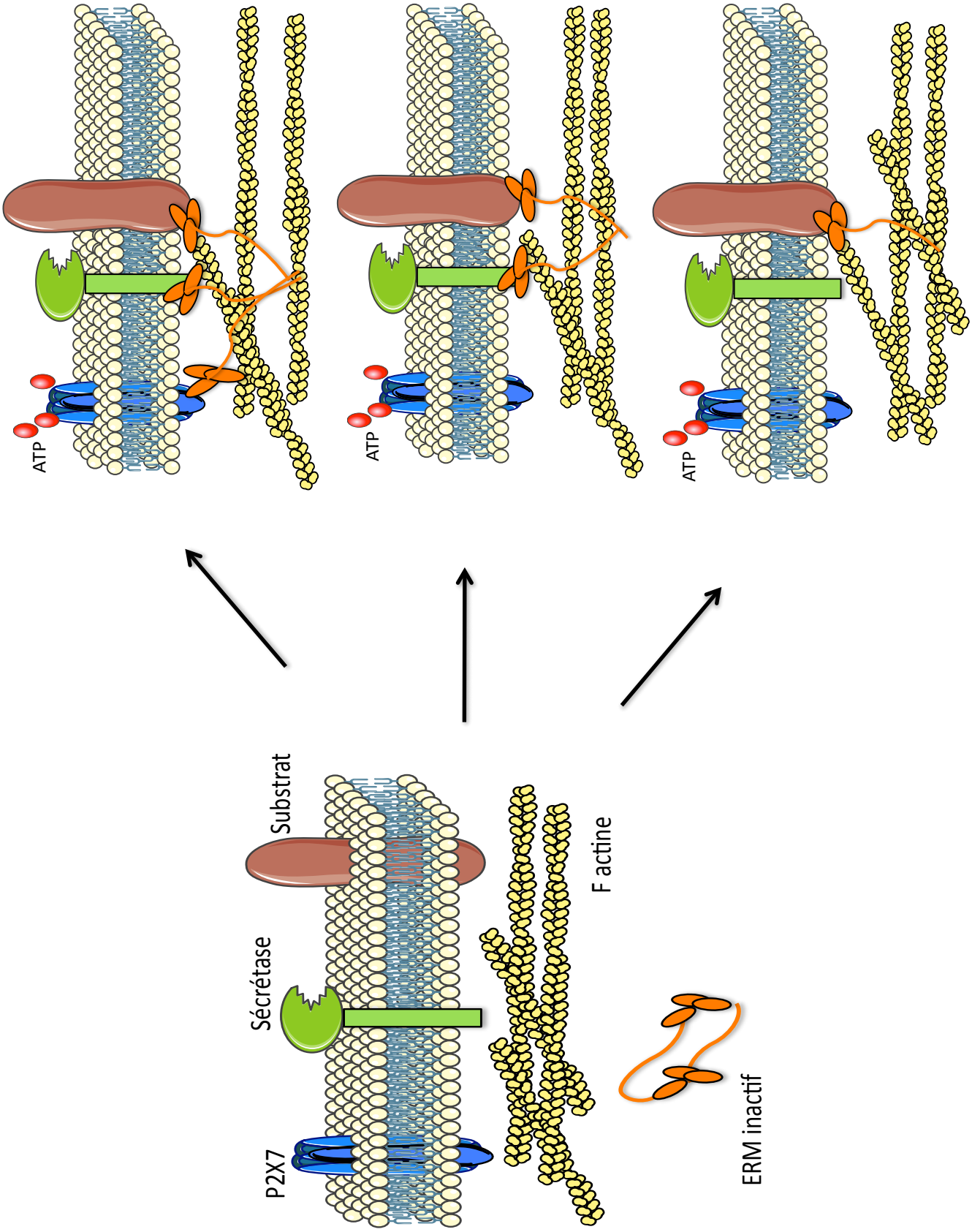


Figure 31 : Résumé des hypothèses concernant le rôle des ERM dans le rapprochement des molécules de surface responsables de la coupure protéolytique.

Hypothèses 1 et 2:

Nous pouvons imaginer que les ERM impliquées dans la coupure de l'APP agissent non pas au niveau du P2X7R mais en aval de celui-ci en interagissant avec d'autres cibles (Figure 31). Les ERM se fixant au récepteur interviendraient dans une autre voie biochimique. Comme nous l'avons dit précédemment, l'identification de la séquence peptidique du récepteur P2X7 impliquée dans la liaison à l'ezrine et les mutations introduites dans cette séquence devraient permettre de démontrer si l'interaction P2X7R/Ezrine est indispensable à la coupure protéolytique de l'APP ou si cette interaction entraîne, par exemple, un adressage du récepteur P2X7 vers des compartiments intracellulaires.

En effet, différents travaux ont démontré un rôle important des ERM dans le recyclage de récepteurs. Les travaux de Cant et coll. ont montré une co-localisation de l'ezrine et du récepteur β2 adrénergique dans des vésicules d'endocytose (182). De plus, la transfection par un dominant négatif de la N-ezrine diminue fortement l'endocytose du récepteur (182). Les ERM sont également responsables du recyclage à la membrane d'autres récepteurs tels que NHE3 (161) et le récepteur α_{1b} adrénergique (178). Ces observations permettent de faire l'hypothèse que la liaison ezrine/P2X7R est impliquée dans une voie biochimique indépendante de la coupure de l'APP. Cette interaction pourrait jouer un rôle dans l'endocytose ou le recyclage du récepteur. Nos données démontrent que l'inhibition des ERM n'a pas d'effet significatif sur la quantité de récepteur P2X7 contenue dans le lysat cellulaire suggérant que les ERM ne sont pas impliquées dans le trafic du P2X7R (Figure 4E de l'article). Cependant, des techniques de biotinylation des protéines de surface en présence et en absence de siARN ciblant les ERM auraient permis de comparer de façon plus précise la quantité de P2X7R présente à la membrane plasmique.

Enfin, il serait intéressant d'analyser le trafic du récepteur en absence des ERM ou en présence d'un dominant négatif de l'ezrine.

APP murin et humain : région cytosolique pHi 7,03

KKKQYTSIHHGVVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN

ADAM10 murin et humain: région cytosolique pHi 12,01

GFIKICSVHTPSSNPKLPPPKPLPGTLKRRRPPQPIQQPPRQRPRESYQMGHMRR

ADAM17 murin : région cytosolique pHi 5,28

CVDKKLDKQYESLSLFHHSNIEMLSSMDSASVRIIKPFPAPQTPGRLQALQPAAMMPP
VPAAPKLDHQRMDTIQEDPSTDSHADDDGFEKDPFPNSSTAAKSFEDLTDHPVTRSE
KAASFKLQRQSRVDSKETEC

Figure 32 : Séquences des régions intracytoplasmique et points isoélectriques des protéines APP, ADAM10 et ADAM 17.

Les sites potentiels de fixation aux ERM sont surlignés en vert et les acides aminés basiques sont indiqués en rouge.

L'APP semble être un bon candidat pour fixer les ERM. Bien que le pHi de sa région cytosolique ne soit pas basique, la présence de la séquence KKK dans sa région juxtamembranaire suggère qu'il existe un site potentiel de liaison aux ERM (Figure 32). Dans la région juxtamembranaire, la séquence KKK, déjà impliquée dans la liaison CD44/ERM pourrait permettre une association APP/ERM.

La délétion de la partie intracytoplasmique de l'APP ou la mutation de la séquence KKK prouverait l'importance de cette région dans la liaison aux ERM et dans la coupure de l'APP. Cependant, la transfection d'un APP muté dans un modèle cellulaire exprimant un APP endogène pourrait être un obstacle majeur si ces deux molécules s'oligomérisent à la surface cellulaire. En effet, l'oligomérisation de l'APP muté et endogène pourrait entraîner la coupure de l'APP tronqué suite à la fixation des ERM à l'APP endogène (Figure 33).

De plus, l'association en cis de l'APP à d'autres protéines de surface capables de lier les ERM aurait les mêmes conséquences (Figure 33).

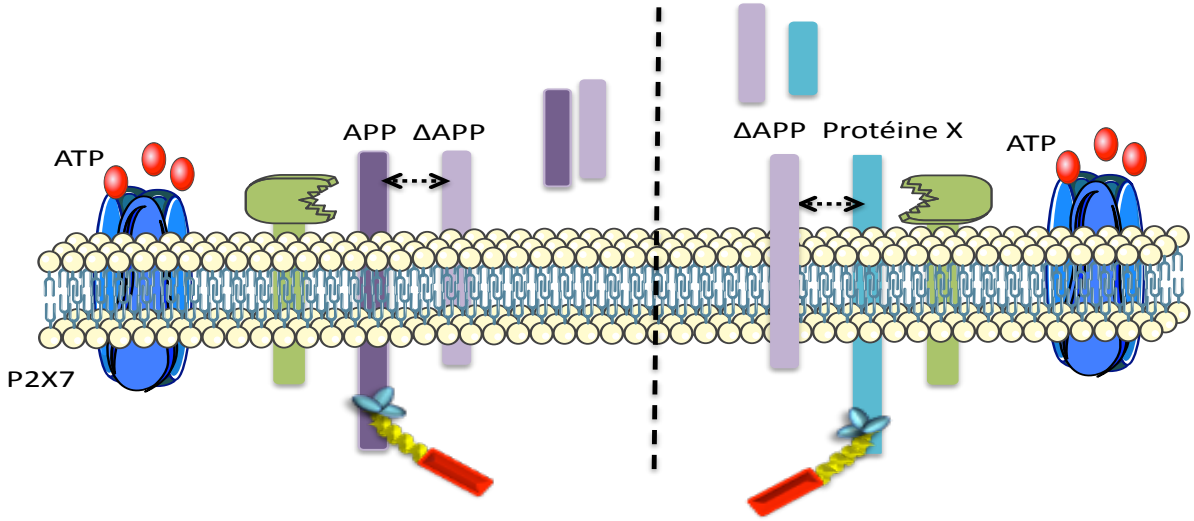


Figure 33 : Exemple d'une liaison en cis entre l'APP endogène et l'APP muté (à gauche) ou d'une liaison avec une autre protéine capable de lier les ERM.

La stimulation du P2X7R pourrait provoquer l'association de l'APP endogène, liant les ERM, à l'APP muté dans la région cytosolique. Nous émettons l'hypothèse qu'une telle association pourrait exister et serait un obstacle à notre étude.

Cependant, comme l'ont montré Maretzky et coll., après la stimulation par le PMA de fibroblastes embryonnaires, l'étude de la coupure de nombreux substrats spécifiques d'ADAM17 (ligands des EGF-R, ICAM1, L-sélectine) montre que l'absence d'iRhom2 entraîne l'inhibition du clivage de certaines molécules uniquement (225). En effet, les coupures des substrats HB-EGF et KitL2 sont inhibées dans un modèle cellulaire iRhom2$^{-/-}$ tandis que le TGFα et CD62L sont toujours clivés. Les auteurs ont produit différentes protéines chimères à partir du HB-EGF et du TGFα qui sont respectivement dépendant ou non d'iRhom2. Les protéines chimères ont été produites en remplaçant les régions cytosoliques et transmembranaires de l'HB-EGF par celles du TGFα et *vice versa*. Grâce à ces protéines chimères, les auteurs montrent très clairement que les régions transmembranaire et cytosolique dictent la dépendance ou non à iRhom2 (225).

Il semble qu'iRhom2 ne soit pas primordiale dans la maturation du pool complet d'ADAM17 mais qu'elle soit impliquée dans la sélectivité de l'enzyme pour son substrat. Dans cette optique, il n'est pas exclu que la région cytosolique de certains substrats puisse être essentielle à leur reconnaissance par l'enzyme. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les protéines coupées de façon indépendante des iRhoms sont des protéines connues pour lier les

ERM. Bien que le nombre de protéines testées soit limité, nous faisons l'hypothèse que les protéines liant les ERM sont indépendantes d'iRhom2.

D'autres études effectuées sur la molécule CD44 sont en faveur de nos hypothèses. La molécule CD44 est très étudiée pour sa coupure. Deux articles montrent qu'en absence de stimulation, CD44 est en interaction avec une autre protéine de la famille 4.1, la merline (NF2) (319 , 320). Comme cela est expliqué dans l'introduction, la merline est inactive à l'état phosphorylé et sa déphosphorylation conduit à son activation. Une des études propose un modèle dans lequel la stimulation de CD44 entraîne la dissociation de la merline de CD44 et l'association aux ERM (321). Cette équipe propose plus exactement que la formation d'un complexe dimérique de ces protéines régule l'action des protéases et la coupure de ces molécules. Cette association conduit *in fine* à la coupure de CD44 et à la libération de son ectodomaine. Dans cette étude, les auteurs observent que, suite à une stimulation par le TPA, les molécules CD44 interagissent entre elles par des ponts disulfures. Par ailleurs, la mutation du domaine de liaison aux ERM conduit bien à une diminution de la coupure protéolytique (321).

Dans ce modèle, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en liant les substrats, les ERM les regroupent, favorisent leurs homo-multimérisations et leurs coupures. La régulation du clivage passerait par l'interaction à l'état basal de l'association de la merline au substrat qui inhibe sa coupure. L'ensemble de ces résultats serait en faveur de l'hypothèse 1 : la liaison des substrats des sécrétases-α aux ERM est indispensable à leurs clivages.

Liaison ERM/Protéase

L'identification de la sécrétase-α responsable de la coupure de l'APP après stimulation du P2X7R est nécessaire si l'on veut pouvoir tester l'interaction de cette protéase avec les ERM.

L'implication d'une interaction protéase/ERM indispensable au clivage protéolytique reste très discutée. L'analyse des séquences cytosolique des ADAM10 et 17 montrent qu'ADAM10 présente un site potentiel de fixation aux ERM tandis qu'ADAM17, qui par ailleurs a un pHi acide, ne semble pas en posséder (Figure 32).

Plusieurs données de la littérature suggèrent que la partie cytosolique des ADAM n'est pas nécessaire à leur activité. En effet, Le Gall et coll. ont démontré que la délétion de la partie cytosolique d'ADAM17 n'empêchait pas la coupure de certains ligands des EGF-R après stimulation au Bz-ATP, à l'acide lysophosphatidique (LPA), à la thrombine (Thr), au TNFα

ou à l'EGF (218). Les résultats de Le Gall et coll. ont été confirmés récemment par Hartmann et coll (321). Dans ces travaux, les auteurs observent également que la délétion de la partie cytosolique d'ADAM10 n'inhibe pas la coupure de CD44 (321). Cependant, d'autres études suggèrent que la phosphorylation de la thréonine 735 par le PMA est indispensable à la maturation et à l'adressage d'ADAM17. Ces différentes études sont très convaincantes bien qu'elles aboutissent à des conclusions opposées.
Dans notre modèle Neuro-2a, la coupure de l'APP est indépendante des ADAM9, 10 et 17 mais il n'est pas exclu que l'ADAM non identifiée se lie aux ERM comme ADAM8 (168).

Hypothèse 3 :

La dernière hypothèse envisage l'interaction des ERM avec les domaines intracellulaires du récepteur, de la sécrétase-α et de son substrat. En effet, nous pouvons supposer que ces liaisons entraînent le regroupement de ces protéines favorisant la transduction des signaux et *in fine* la coupure protéolytique du substrat.
Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant la technique de PLA appliquée aux molécules exprimées à la membrane plasmique. En utilisant des anticorps dirigés contre la partie extracellulaire de chaque protéine, on pourrait déterminer s'il existe un rapprochement des différentes molécules après une stimulation au Bz-ATP. Afin d'inhiber le clivage très rapide, cette expérience s'effectuera en présence d'inhibiteurs des métalloprotéases tels que le batimastat ou le GM-6001 qui inhiberont la coupure et la disparition des substrats de la membrane plasmique. Ainsi, le regroupement des substrats et des enzymes sera stabilisé.
Une alternative à la PLA serait de marquer les différentes protéines par trois fluorochromes différents et d'observer par vidéo microscopie la dynamique des différentes protéines et leurs interactions. Ce type d'expériences se rapprocherait de celles réalisées par l'équipe de Rubinstein (322) qui a observé le déplacement des tétraspanines CD9 et leurs regroupements en micro agrégat. De plus, par la technique de microscopie PALM, Shrivastava et coll ont pu observer que l'ajout d'ATP diminue la mobilité des récepteurs P2X7 mutés par rapport aux récepteurs contrôles (47).

1.5 Les ERM sont-elles indispensables à la coupure protéolytique de toutes les molécules de surface?

Les résultats que nous avons obtenus et ceux de la littérature internationale nous ont conduit à faire l'hypothèse que les ERM sont indispensables à la coupure protéolytique des récepteurs membranaires qui peuvent être clivés et libérés sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. La limitation de notre modèle actuel est due au fait que nous n'avons pas identifié la protéase responsable de la coupure de l'APP après stimulation du P2X7R. Afin de résoudre ce problème, nous nous sommes intéressés au rôle des ERM dans le clivage protéolytique d'autres molécules de surface.

Suite à un crible de molécules de surface coupées après stimulation de P2X7R, nous nous sommes intéressés à la molécule d'adhésion NrCAM qui est impliquée dans la prolifération de certaines lignées tumorales après clivage protéolytique de son ectodomaine (323). Très brièvement, NrCAM (ou Bravo) est une glycoprotéine membranaire de type 1 appartenant à la famille des molécules d'adhérence cellulaire (CAM). Sa partie extracellulaire est constituée de six domaines de type immunoglobuline et de quatre domaines de type fibronectine III qui contient un site de clivage par la furine. Elle est suivie d'une région transmembranaire et d'une partie cytoplasmique de 110 acides aminés. La région cytosolique de NrCAM est composée d'un motif PDZ et d'une séquence RNGGKYPVKE susceptible d'interagir avec le domaine FERM des ERM (Figure 34) (324).

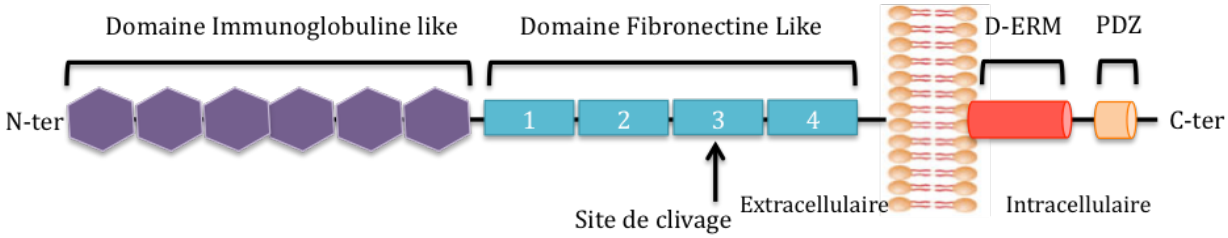


Figure 34 : Représentation schématique de la molécule d'adhérence NrCAM.

Nous disposons de nombreux mutants de NrCAM, produits par le Dr Faivre Saraillh *(UMR 7286 - Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille)*. Ces mutants devraient nous permettre de déterminer quelle est la région de NrCAM impliquée dans le clivage protéolytique dépendant des ERM (Figure 35).

Objectif N°1 : Déterminer si les ERM sont indispensables au clivage protéolytique induit par la stimulation du P2X7R et les esters de phorbol.

Afin d'utiliser des modèles cellulaires définis, nous avons produit des clones de transfectants stables du P2X7R à partir de fibroblastes embryonnaires (MEF) de souris WT, KO pour ADAM10 ou 17 et double KO. Nous projetons d'étudier l'effet de la stimulation du P2X7R dans ces lignées de MEF et déterminerons si les ERM sont indispensables au clivage de tous les ligands, qu'ils soient coupés par ADAM 10 ou 17.

Nous avons déjà montré dans des neuroblastomes que la stimulation du P2X7R entraîne la coupure protéolytique de NrCAM et que celle-ci est induite par ADAM17 (résultats préliminaires). Les ERM sont nécessaires car l'inhibition de leur expression par siRNA bloque ce clivage. Afin d'établir s'il existe une fixation des ERM à la région cytosolique de NrCAM, nous avons testé les différents mutants dans les cellules Neuro-2a et nous avons observé après stimulation du P2X7R le clivage de tous ces mutants (Figure 35). Ce résultat nous a amenés à faire l'hypothèse que les molécules de NrCAM mutantes s'associent aux molécules NrCAM endogènes entraînant leurs coupures (Tableau 8). Afin d'éviter ce problème, nous comparerons la coupure de NrCAM et de ses mutants dans les MEF, qui ne l'exprime pas spontanément. Ces expériences devraient nous permettre de déterminer si les mutants de NrCAM sans région cytosolique ou sans site de fixation potentiel aux ERM sont ou ne sont plus clivés.

Par ailleurs, Le Gall et coll. (228) ont montré que la stimulation du P2X7R entraîne un clivage de ligands des EGF-R tels que le TGFα et la betacelluline, respectivement par ADAM17 et ADAM10. Nous avons entrepris de déterminer quels sont les ligands des EGF-R, clivés par ADAM10 ou 17, dont le clivage protéolytique est dépendant des ERM.

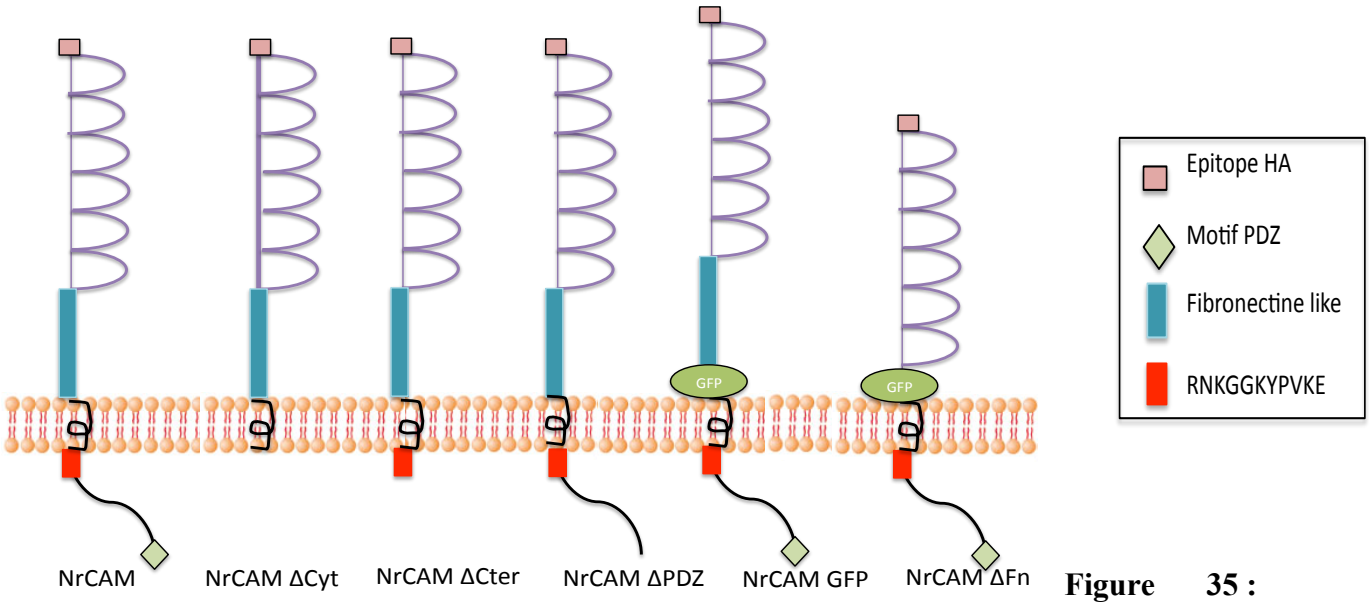


Figure 35 : Représentation schématique des mutants de la molécule NrCAM obtenus par le Dr Faivre Saraillh.

Les différentes constructions de NrCAM sont étiquettées par l'épitope HA et/ou la GFP. Le mutant ΔCyt (ΔCytosolique) ne possède plus de région intracellulaire. Le mutant ΔCter (ΔC-terminal) est constitué uniquement de la région susceptible de fixer les ERM dans sa région intracellulaire. Le mutant ΔPDZ ne possède plus son domaine PDZ. Enfin le mutant NrCAM ΔFn n'a plus la région fibronectine-like qui contient la séquence consensus de coupure.

	NrCAM endogène	NrCAM taggué HA	NrCAM ΔFn	NrCAM ΔC-terminal	NrCAM ΔCytosolique	L-Selectine
Stimulation au Bz-ATP	Coupure	Coupure	Coupure	Coupure	Coupure	Coupure
Effet d'antagonistes du P2X7R	Absence de coupure	Absence de coupure	Absence de coupure	Absence de coupure	Absence de coupure	Absence de coupure
Effet des siARN ADAM10	Coupure					Coupure
Effet des siARN ADAM17	Absence de coupure					Absence de coupure
MEF contrôle		Coupure	Coupure	Coupure	Coupure	
MEF dKO Ad10/17		Absence de coupure	Absence de coupure	Absence de coupure	Absence de coupure	
Effet des si ARN ERM	Absence de coupure					Absence de coupure
Interaction avec les ERM	En cours	Positive	Positive	Positive	En cours	Positive

Tableau 8 : Résultats préliminaires obtenus sur NrCAM endogène, les mutants cités ci-dessus et sur la molécule L-selectine constituant le contrôle positif.

Les cellules des neuroblastomes murin Neuro-2a et humain SK-N-BE sont stimulées par 1mM de Bz-ATP. Cette activation provoque la coupure protéolytique de la molécule NrCAM endogène et des différents mutants. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologique o-ATP et A-438079 démontre que cette coupure est dépendante du P2X7R. L'inhibition de l'expression d'ADAM17 par des si ARN réduit fortement la coupure de la molécule endogène. La transfection des mutants dans des cellules MEF double KO ADAM10 et 17 a les mêmes conséquences. L'inhibition des ERM provoque une nette diminution du clivage de NrCAM. Des expériences préliminaires de GST pull down, de GFP trap et de co-immunoprécipitation ont mis en évidence l'interaction des ERM avec les molécules NrCAM.

Objectif N°2 : Rechercher une interaction entre les substrats, les ADAM et les ERM.

Nous avons testé l'interaction potentielle de NrCAM et d'ADAM10 et 17 avec les ERM par des techniques d'immunoprécipitation classiques sans succès. Il est connu des scientifiques travaillant dans le domaine que la co-immunoprécipitation des ERM avec les molécules fixées est une tâche délicate. Nous avons donc utilisé des techniques recommandées par des experts de la biochimie des ERM (communication personnelle des Drs Arpin et Alcover).

1) La technique de « GFP » Trap utilise le domaine variable d'un anticorps anti-GFP de Lama Alpaca capable de fixer la GFP avec une très haute affinité qui est couplé à une matrice monovalente. Des cellules ont été transfectées par une construction comportant l'ezrine fusionnée à la GFP (expérimental) ou un plasmide codant la GFP (contrôle). Après transfection, les cellules ont été lysées et des immunoprécipités ont été réalisés avec du gel GFP-Trap. Les protéines fixées au gel sont analysées en western-blots avec des anticorps spécifiques des substrats et des ADAM. Nos résultats préliminaires montrent qu'ADAM10 et NrCAM interagissent avec l'ezrine et que cette interaction est dépendante de la stimulation par l'ATP.

2) Une méthode de « pull down » utilisant l'ezrine fusionnée à la Glutathion-S-tranférase est mise en œuvre avec les protéines fusions provenant des plasmides codant l'ezrine-fusionnée à la GST (expérimental), l'extrémité N-terminale de l'ezrine-GST (expérimental) et la partie C-terminale de l'ezrine-GST (contrôle négatif) (don des Dr Arpin et Alcover). Nous avons produit ces protéines fusions et nous avons montré qu'ADAM10 et NrCAM se fixent spécifiquement à ezrine-GST. Ce résultat préliminaire montre que dans certaines conditions l'interaction entre l'ezrine et la molécule pré-existe avant toute stimulation de P2X7R.
Ces deux types d'approches sont poursuivis et différentes méthodes de solubilisation des membranes sont en cours d'étude. En effet, des travaux récents ont montré que l'ADAM10 est associée à certaines tétraspanines ce qui nous incite à tester des détergents tels que le Brij97 qui permettent de maintenir le « réseau des tétraspanines » et les interactions avec ADAM10.

Objectif N°3 : Après stimulation du P2X7R, l'interaction des ADAM et des ligands des EGF-R à la membrane plasmique est-elle dépendante des ERM ?

Dans notre publication, nous avons utilisé la technique Duolink de PLA pour mettre en évidence l'interaction du P2X7R et de l'ezrine phosphorylée. Nous utiliserons cette méthode pour détecter une interaction entre un substrat et une ADAM et démontrer qu'elle est dépendante des ERM. Nous possédons des plasmides codant le TGFα normal ou une forme mutée du TGFα dans la région extracellulaire qui ne peut plus être coupée par ADAM17. Ces formes mutée et non-mutée de TGFα sont utilisées en collaboration avec les Drs Le Gall et Blobel. Les plasmides codant ces TGFα seront utilisés pour transfecter les cellules MEF wt, ADAM10 ko et ADAM17 ko. Après transfection, les cellules seront stimulées par du Bz-ATP ou par PMA/Ionomycine (pour agir en aval de P2X7R) et fixées par du paraformaldéhyde. Des anticorps anti-TGFα et anti-ADAM10 et 17 couplés à des oligonucléotides comme il est recommandé dans la méthode Duolink PLA, seront utilisés pour démontrer la proximité entre le TGFα et l'ADAM17. L'utilisation du TGFα non clivable est très importante car elle devrait permettre de stabiliser l'interaction avec l'ADAM17, alors que le TGFα normal sera coupé et libéré dans le surnageant de culture. Si le TGFα et l'ADAM17 sont colocalisés, la méthode du PLA permettra de détecter des points immunofluorescents qui seront absents des cellules MEFs ADAM17 ko. Le rôle des ERM dans cette interaction sera testé en transfectant les cellules MEFs par des siRNA spécifiques des ERM. Si l'interaction et le clivage sont dépendants des ERM, la proximité du TGFα et d'ADAM17 devrait disparaître dans les MEFs transfectées par les siRNA spécifiques et pas avec les siRNA contrôles.

Dans cette discussion, nous proposons comme généralisable le rôle des ERM dans la coupure de protéines de surface. Cependant, il est nécessaire de rappeler que les ERM peuvent être activées sans induire de coupure. La mutation R357A de CD62L abroge sa liaison aux ERM et inhibe sa coupure après une stimulation par le PMA. En revanche, la stimulation par la cantharidine, un activateur de la MAPKinase p38 induit la phosphorylation des ERM et entraîne la coupure de ce mutant de CD62L. Ainsi, comme le démontrent Killock et coll., la coupure de CD62L peut être le résultat de l'activation de deux voies biochimiques différentes dans l'une desquelles l'interaction substrat/ERM n'est pas requise (325). Cependant, dans cette étude les conséquences de l'inhibition de l'activation des ERM après une stimulation à la cantharidine n'ont pas été étudiées. En effet, des expériences de siARN spécifiques des

ERM n'ont pas été faites. Ainsi, on peut suggérer que l'activation des ERM et non leur interaction avec le substrat joue un rôle dans cette voie biochimique.

Par ailleurs, nous avons démontré que la phosphorylation des ERM n'est pas systématiquement associée à la coupure protéolytique des protéines membranaires. En effet, la stimulation des cellules Neuro-2a par le NGF (Nerve Growth Factor) active un récepteur à activité tyrosine kinase (TrkA) qui provoque la phosphorylation des ERM, sans entraîner le clivage de l'APP (cf. figure 6 des résultats de l'article JBC).

1.6 Dualisme du récepteur P2X7 : neuroprotection *vs* neuroinflammation

Il est clairement établi que de nombreuses populations cellulaires du SNC expriment le P2X7R, en particulier les cellules de la microglie, responsables de l'immunité au niveau cérébral. Dans la microglie, le récepteur P2X7 est très étudié pour son implication dans les phénomènes inflammatoires au vu de son rôle dans la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18.

Dans de nombreuses pathologies, P2X7R semble être délétère. Dans la maladie d'Alzheimer différentes études suggèrent que l'activation du P2X7R aggrave la pathologie. L'injection de peptides Aβ1-42 dans l'hippocampe de rat par des méthodes stéréotaxiques aboutit à une accumulation de cellules microgliales, à une augmentation de la quantité de récepteurs P2X7 dans ces régions de l'hippocampe, à une perte neuronale et à un accroissement de la perméabilité de la barrière hémato-méningée (103). Chez ces rats, l'injection intra-péritonéale de l'antagoniste du P2X7R, le BBG, protège ces animaux. En effet, le BBG diminue l'infiltration par les cellules microgliales, l'expression du P2X7R, la mort neuronale ainsi que la perméabilité de la barrière hémato-méningée. L'inhibition pharmacologique du récepteur P2X7 atténue certains symptômes de la MA (103). Cependant, ce travail reste critiquable car ces résultats n'ont pas été confirmés dans un modèle animal où le P2X7R a été invalidé. En effet, la spécificité du BBG pour le P2X7R n'étant pas absolue, il est possible que cette molécule agisse sur une autre cible. De nombreuses études attribuent au récepteur un rôle important dans les phénomènes neurodégénératifs. En effet, en utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques de P2X7 et de P2Y2, les auteurs concluent que dans les cellules Neuro-2a la coupure non amyloïdogénique est due à l'activation de P2Y2 (326). Cependant, Leon-Otegui et coll. ont injecté du BBG à des souris transgéniques pour une APP humaine mutée comportant les mutations swedish et Indiana. Ces souris développent rapidement des plaques amyloïdes dès 6-8 mois. Le traitement par le BBG a provoqué une diminution des plaques amyloïdes au niveau de l'hippocampe associée à une augmentation de l'activité sécrétase-α (327). Il est regrettable que dans ces deux études, aucune expérience n'ait été effectuée sur des modèles murins KO pour P2X7R et P2Y2R (326 , 327).

Dans le SNC, la phagocytose est un processus physiologique essentiel à l'élimination des cellules apoptotiques qui favorise la neurogénèse et empêche les réactions neuro-inflammatoires. L'activation du P2X7R est associée à une réduction de la clairance des peptides aβ. En effet, Ni et coll. (328) ont démontré que l'inhibition par siARN du P2X7R ou

l'utilisation du BBG favorise la clairance des agrégats amyloïdes (328). Les auteurs se sont ensuite intéressés à l'effet des cytokines pro-inflammatoires, IL-1β et TNFα dans la phagocytose des peptides aβ1-42. Après stimulation par le Bz-ATP et addition des peptides aβ, seule l'IL-1β provoquait une réduction de la clairance de ces peptides. Ce mécanisme suggère que la production d'IL-1β après une stimulation du P2X7R serait responsable de la diminution de la clairance des peptides aβ (328). L'ensemble des évidences expérimentales suggère très fortement que le P2X7R a une fonction pro-inflammatoire dans la microglie. Cependant, le rôle du P2X7R dans le SNC est mal connu et complexe. En effet, aucune étude n'a identifié les isoformes du P2X7R exprimées dans les nombreux types cellulaires laissant présager que celui-ci pourrait avoir des fonctions différentes.

Dans cette seconde partie, nous présenterons un ensemble d'expériences suggérant un rôle neuroprotecteur du P2X7R contredisant son implication dans la neuroinflammation.

En effet, certaines études suggèrent que le P2X7R pourrait avoir une fonction neuroprotectrice, en protégeant les neurones d'une toxicité induite par le glutamate ou en favorisant la neurogénèse et la synaptogénèse dues à la libération du fragment neurotrophique de l'APP.

Ortega et coll. ont démontré un rôle neuroprotecteur du P2X7R dans les cellules granulaires du cervelet de rat (329). Dans ces neurones, les auteurs ont montré que l'activation des récepteurs NMDA (NMDAR), TrkB et P2X7 entraîne la phosphorylation inhibitrice de GSK3 en activant différentes voies de signalisation (Figure 36). Ils démontrent que la stimulation du P2X7R et du NMDAR active la PKC qui provoque la phosphorylation de GSK3 et aboutit à une neuroprotection en favorisant la survie des cellules. En revanche, la stimulation du récepteur TrkB par son ligand le BDNF emprunte une voie dépendante de la PLCγ, de la PI3K et d'Akt pour maintenir l'inhibition de GSK3 et favoriser la neuroprotection (Figure 36) (329).

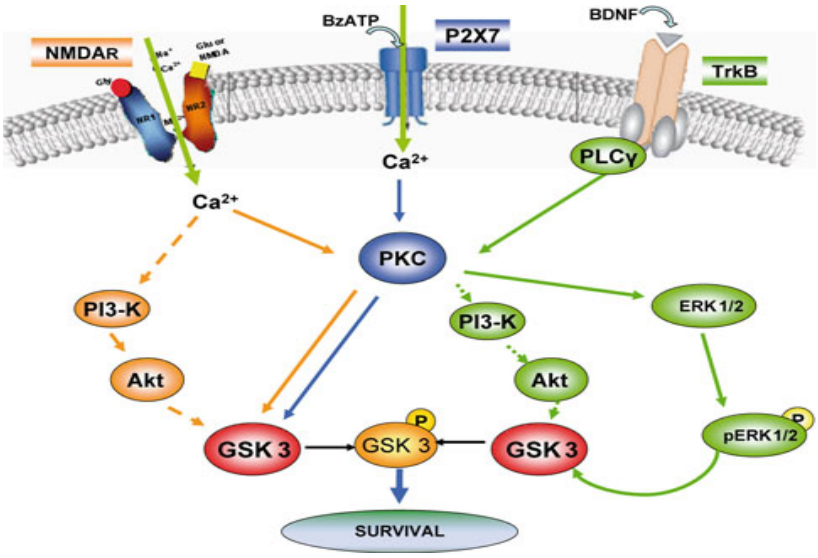


Figure 36 : Représentation des voies biochimiques induites par les récepteurs NMDA, TrkB et P2X7 responsables de l'inhibition par phosphorylation de GSK3. Ces voies promeuvent la survie des cellules granulaires du cervelet. D'après (329).

Suzuki et coll. (330) ont démontré qu'une stimulation de la microglie par l'ATP ou le Bz-ATP provoque la coupure et la libération de la cytokine pro-inflammatoire TNF. Une co-culture de microglie et de neurones a permis de montrer que la libération du TNF, suite à l'activation du P2X7R, protège les neurones d'une mort cellulaire induite par le glutamate. Ces résultats suggèrent que l'activation du P2X7R de la microglie et la libération du TNF jouent un rôle neuroprotecteur (330).

La surexpression du P2X7R autour des plaques amyloïdes a amené le Dr Delarasse à explorer l'effet de la stimulation du récepteur P2X7 dans la coupure de l'APP (316). Ces expériences *in vitro* ont montré que le P2X7R avait probablement un rôle protecteur car il est responsable de la libération du fragment neurotrophique sAPPα. Ce résultat a été confirmé dans différentes lignées de neuroblastomes mais également dans des cultures primaires d'astrocytes et de cellules progénitrices neurales invalidées pour le P2X7R. Cependant, ces données obtenues *in vitro* devront être validées dans un modèle *in vivo*. Dans la maladie d'Alzheimer, nos résultats sont en contradiction avec les conclusions des travaux de Leon-Otegui et coll. (326).

Au vu de tous ces résultats, nous faisons l'hypothèse que dans la maladie d'Alzheimer, P2X7R pourrait jouer un rôle différent en fonction du stade de la maladie. A la phase précoce, P2X7R aurait un rôle bénéfique en activant la voie non amyloïdogénique qui produit le fragment neuroprotecteur sAPPα et empêche la libération des peptides toxiques aβ. De plus, à ce stade P2X7R pourrait participer au recrutement de cellules microgliales et à la sécrétion d'IL-1β favorisant ainsi la clairance des peptides aβ. Cependant, à des stades plus avancés de la pathologie, l'accumulation d'agrégats toxiques aβ provoque une activation des cellules microgliales qui ne peuvent plus éliminer ces agrégats et qui vont libérer des quantités très importantes de cytokines pro-inflammatoires. Cette inflammation va stimuler la mort neuronale et aggraver la pathologie.

Le double rôle d'un récepteur dans une autre pathologie du SNC a déjà été décrit. En effet, dans l'EAE, un modèle expérimental de sclérose en plaques, il a été démontré que l'expression de Fas sur les oligodendrocytes et de Fas-L sur les lymphocytes T CD4+ agressifs joue un rôle aggravant dans le développement de la pathologie (331). Par contre, en phase de rémission, on observe une modification de l'expression de Fas et FasL (331). En effet, les cellules résidentes du SNC expriment FasL alors que les lymphocytes T CD4+ spécifiques présentent à leur surface la molécule Fas. De ce fait, les lymphocytes T agresseurs sont éliminés par apoptose et l'EAE entre en phase de rémission (331, 332).

1.7 Conséquences de l'activation du P2X7R dans la coupure protéolytique

Alors que les études sur les voies d'activation du P2X7R aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires sont très nombreuses, celles portant sur le clivage protéolytique des protéines transmembranaires sont en nombre limité. Pourtant, la libération d'ectodomaines par coupure protéolytique génère un grand nombre de molécules très importantes sur le plan physiologique ou physiopathologique, telles que les cytokines, des facteurs de croissance, des molécules d'adhérence etc… Il a été montré que la dérégulation de la libération contrôlée d'ectodomaines peut aboutir au développement de pathologies comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, l'inflammation ou le cancer. L'implication des ADAM dans ces nombreuses pathologies est suggérée par de nombreux travaux. La stimulation du P2X7R aboutit à l'activation d'ADAM10 et 17 qui sont des protéases à large spectre de substrats (228). En particulier, l'activation d'ADAM17 entraîne la coupure de plusieurs ligands des EGFR : HB-EGF, TGFα, epiregulin, amphireguline (333).

Ces ligands sont initialement des molécules transmembranaires qui doivent être clivées pour être libérées sous forme active soluble. Il nous semble important de signaler que de nombreux travaux ont montré que la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G est capable d'entraîner une activation des voies biochimiques situées en aval des EGFR. Cette activation est provoquée par la libération des ligands des EGFR par les ADAM membranaires (Figure 37). Ce modèle de signalisation croisée entre RCPG et EGFR a été identifié pour différents couples de RCPG-EGFR mais aucune étude n'a testé l'existence d'un tel mécanisme dans le cas du P2X7R (334 , 335). En effet, la stimulation du P2X7R provoque une activation des ADAM et entraîne la libération d'un ligand d'EGFR capable de stimuler, en cis ou trans, les cellules porteuses de l'EGFR correspondant (208 , 336). Ce modèle nous intéresse particulièrement car il a été récemment démontré que l'amphireguline, un ligand des EGF-R clivé après stimulation du P2X7R (Communication personnelle, (228)) joue un rôle fondamental dans la réparation des tissus à la suite d'une infection ou d'une atteinte auto-immune. Il a été démontré que, suite à des stimuli inflammatoires, de nombreuses cellules sont capables d'exprimer l'amphireguline (337): les basophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques, et certains lymphocytes CD4+ Foxp3+ présents dans les muscles lésés (338).

Nous pensons qu'il serait important de déterminer si les lymphocytes T CD4+ Foxp3+, qui expriment la plus grande quantité de P2X7R par rapport aux autres lymphocytes T (339), peuvent activer la voie amphireguline/récepteur à l'EGFR. En effet, il a été clairement démontré que les lymphocytes T régulateurs expriment des EGFR capables de fixer l'amphireguline (340). De plus, Zaiss et coll. ont démontré que l'effet protecteur des lymphocytes T régulateurs était médié par l'amphireguline et le récepteur EGFR car en leur absence l'effet biologique protecteur disparaissait. Cet effet biologique n'était pas dû à une induction de la prolifération des cellules régulatrices mais à une augmentation de leur capacité suppressive et réparatrice (340). Notre équipe a accès à des souris Foxp3+ GFP CRE P2X7 $^{lox/lox}$ qui n'expriment plus le P2X7R dans les lymphocytes T régulateurs, il serait donc possible de comparer l'effet de l'ATP sur les cellules T régulatrices (GFP+, P2X7R+) contrôles et sur celles qui n'expriment plus le P2X7R. On pourrait donc isoler, sur la base de l'expression de la GFP, les lymphocytes T régulateurs, présents dans les tissus enflammés de muscles injectés par de la cardiotoxine. En effet, Burzyn et coll. ont montré que l'injection intra-musculaire de cardiotoxine, un bon modèle expérimental de réparation tissulaire, provoquait une accumulation de lymphocytes T CD4+ conventionnels et régulateurs (338). Au jour 14 après l'injection, 50% des lymphocytes T CD4+ sont régulateurs et expriment un certain nombre de transcrits qui ne sont pas retrouvés dans les cellules T CD4+Foxp3+ de la

rate et des ganglions (338). En particulier, les cellules régulatrices expriment deux facteurs de croissance : le PDGF (platelet-derived growth factor) et l'amphireguline. L'effet de l'ATP sera testé *in vitro* sur la libération de l'amphireguline et du CD62L (contrôle positif) des lymphocytes T CD4+ Foxp3+GFP+ isolés des muscles traités à la cardiotoxine. L'impact de la libération potentielle d'amphireguline sur l'EGFR sera ensuite évalué en analysant la signalisation en aval de l'EGFR. Par ailleurs, ces études *in vitro* devront être complétées par des expériences *in vivo* comparant la capacité de lymphocytes T CD4+ Foxp3+ P2X7R + et de lymphocytes T CD4+ Foxp3+ P2X7R KO à réguler la réparation musculaire. Ce type d'expériences nous semble important à faire pour déterminer la fonction du P2X7R au niveau des lymphocytes T régulateurs impliqués dans la réparation tissulaire. Un autre très bon modèle expérimental *in vivo* pourrait être utilisé pour évaluer le rôle de P2X7R dans une pathologie inflammatoire : la colite induite par transfert de lymphocytes T CD4+ débarrassés des cellules T régulatrices (341 , 342 , 343). Dans ce modèle, on comparera la capacité de lymphocytes T régulateurs exprimant P2X7R et des cellules T régulatrices déficientes en P2X7R à contrôler la colite induite par le transfert de lymphocytes T CD4+ conventionnels.

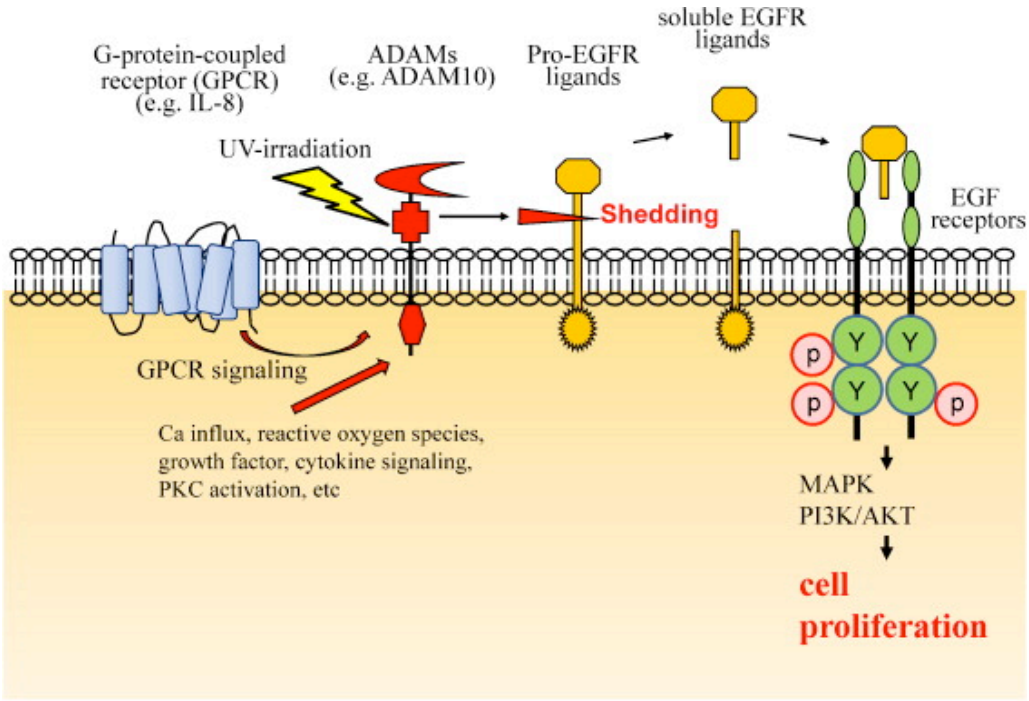


Figure 37 : Mécanismes de la transactivation des EGFR suite à une coupure de leur ligand par une ADAM.

L'activation d'un RCPG conduit à différents signaux tels que l'activation de la PKC, une augmentation du calcium intracellulaire ou la production de ROS. Ces différents signaux vont activer l'ADAM à l'origine de la coupure du ligand de l'EGFR. Le ligand libéré va se fixer sur son récepteur et induire une nouvelle cascade de signalisation. D'après (336).

BIBLIOGRAPHIE

1. Burnstock, G. (2009) Purinergic cotransmission. *Experimental physiology* **94**, 20-24

2. Cotrina, M. L., Lin, J. H., and Nedergaard, M. (2008) Adhesive properties of connexin hemichannels. *Glia* **56**, 1791-1798

3. Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 4702-4711

4. Bao, L., Locovei, S., and Dahl, G. (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS letters* **572**, 65-68

5. Ransford, G. A., Fregien, N., Qiu, F., Dahl, G., Conner, G. E., and Salathe, M. (2009) Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **41**, 525-534

6. Lemaire, I., Falzoni, S., Zhang, B., Pellegatti, P., and Di Virgilio, F. (2011) The P2X7 receptor and Pannexin-1 are both required for the promotion of multinucleated macrophages by the inflammatory cytokine GM-CSF. *J Immunol* **187**, 3878-3887

7. Abbracchio, M. P., and Burnstock, G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics* **64**, 445-475

8. Sperlagh, B., and Illes, P. (2007) Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic signalling* **3**, 117-127

9. Trumel, C., Payrastre, B., Plantavid, M., Hechler, B., Viala, C., Presek, P., Martinson, E. A., Cazenave, J. P., Chap, H., and Gachet, C. (1999) A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* **94**, 4156-4165

10. Cattaneo, M., and Podda, G. M. (2010) State of the art of new P2Y12 antagonists. *Internal and emergency medicine* **5**, 385-391

11. Warny, M., Aboudola, S., Robson, S. C., Sevigny, J., Communi, D., Soltoff, S. P., and Kelly, C. P. (2001) P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry* **276**, 26051-26056

12. Vieira, R. P., Muller, T., Grimm, M., von Gernler, V., Vetter, B., Durk, T., Cicko, S., Ayata, C. K., Sorichter, S., Robaye, B., Zeiser, R., Ferrari, D., Kirschbaum, A., Zissel, G., Virchow, J. C., Boeynaems, J. M., and Idzko, M. (2011) Purinergic receptor type 6

contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* **184**, 215-223

13. Hussl, S., and Boehm, S. (2006) Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **452**, 538-551

14. Weisman, G. A., Ajit, D., Garrad, R., Peterson, T. S., Woods, L. T., Thebeau, C., Camden, J. M., and Erb, L. (2012) Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic signalling* **8**, 559-578

15. Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., and Buell, G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**, 516-519

16. Brake, A. J., Wagenbach, M. J., and Julius, D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**, 519-523

17. Denlinger, L. C., Fisette, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., Proctor, R. A., and Bertics, P. J. (2001) Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**, 1871-1876

18. Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A., and Surprenant, A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal* **20**, 6347-6358

19. Hattori, M., and Gouaux, E. (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**, 207-212

20. Robinson, L. E., and Murrell-Lagnado, R. D. (2013) The trafficking and targeting of P2X receptors. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**, 233

21. Richler, E., Shigetomi, E., and Khakh, B. S. (2011) Neuronal P2X2 receptors are mobile ATP sensors that explore the plasma membrane when activated. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 16716-16730

22. Toulme, E., and Khakh, B. S. (2012) Imaging P2X4 receptor lateral mobility in microglia: regulation by calcium and p38 MAPK. *The Journal of biological chemistry* **287**, 14734-14748

23. Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO journal* **17**, 3016-3028

24. Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D., and Edwardson, J. M. (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors

are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *The Journal of biological chemistry* **280**, 10759-10765

25. Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., and Sato, C. (2005) Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochemical and biophysical research communications* **337**, 998-1005

26. Young, M. T., Fisher, J. A., Fountain, S. J., Ford, R. C., North, R. A., and Khakh, B. S. (2008) Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *The Journal of biological chemistry* **283**, 26241-26251

27. Torres, G. E., Egan, T. M., and Voigt, M. M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry* **274**, 6653-6659

28. Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S., and Murrell-Lagnado, R. D. (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* **72**, 1447-1456

29. Antonio, L. S., Stewart, A. P., Varanda, W. A., and Edwardson, J. M. (2014) Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS letters* **588**, 2125-2128

30. Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J. M., Gorecki, D. C., and Murrell-Lagnado, R. (2009) Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *The Journal of biological chemistry* **284**, 13446-13454

31. Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I., and Weisman, G. A. (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **452**, 552-562

32. North, R. A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* **82**, 1013-1067

33. Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Han, P., and Jarvis, M. F. (2009) Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British journal of pharmacology* **157**, 1203-1214

34. Jarvis, M. F. (2010) The neural-glial purinergic receptor ensemble in chronic pain states. *Trends in neurosciences* **33**, 48-57

35. Kaczmarek-Hajek, K., Lorinczi, E., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012) Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic signalling* **8**, 375-417

36. Mulryan, K., Gitterman, D. P., Lewis, C. J., Vial, C., Leckie, B. J., Cobb, A. L., Brown, J. E., Conley, E. C., Buell, G., Pritchard, C. A., and Evans, R. J. (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* **403**, 86-89

37. Jarvis, M. F., Burgard, E. C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T. J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Chu, K., Lee, C. H., Stewart, A. O., Polakowski, J., Cox, B. F., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J., and Faltynek, C. (2002) A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 17179-17184

38. Gu, B. J., Sun, C., Valova, V. A., Skarratt, K. K., and Wiley, J. S. (2010) Identification of the promoter region of the P2RX4 gene. *Molecular biology reports* **37**, 3369-3376

39. Ulmann, L., Hirbec, H., and Rassendren, F. (2010) P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *The EMBO journal* **29**, 2290-2300

40. Jakobsson, P. J. (2010) Pain: how macrophages mediate inflammatory pain via ATP signaling. *Nature reviews. Rheumatology* **6**, 679-681

41. Yang, T., Shen, J. B., Yang, R., Redden, J., Dodge-Kafka, K., Grady, J., Jacobson, K. A., and Liang, B. T. (2014) Novel protective role of endogenous cardiac myocyte P2X4 receptors in heart failure. *Circulation. Heart failure* **7**, 510-518

42. Cheewatrakoolpong, B., Gilchrest, H., Anthes, J. C., and Greenfeder, S. (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochemical and biophysical research communications* **332**, 17-27

43. Nicke, A., Kuan, Y. H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., Gorecki, D. C., Murrell-Lagnado, R. D., and Soto, F. (2009) A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *The Journal of biological chemistry* **284**, 25813-25822

44. Adinolfi, E., Cirillo, M., Woltersdorf, R., Falzoni, S., Chiozzi, P., Pellegatti, P., Callegari, M. G., Sandona, D., Markwardt, F., Schmalzing, G., and Di Virgilio, F. (2010) Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 3393-3404

45. Feng, Y. H., Li, X., Wang, L., Zhou, L., and Gorodeski, G. I. (2006) A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *The Journal of biological chemistry* **281**, 17228-17237

46. Masin, M., Young, C., Lim, K., Barnes, S. J., Xu, X. J., Marschall, V., Brutkowski, W., Mooney, E. R., Gorecki, D. C., and Murrell-Lagnado, R. (2012) Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts. *British journal of pharmacology* **165**, 978-993

47. Shrivastava, A. N., Rodriguez, P. C., Triller, A., and Renner, M. (2013) Dynamic micro-organization of P2X7 receptors revealed by PALM based single particle tracking. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**, 232

48. Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. A., and Surprenant, A. (1999) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *The Journal of physiology* **519 Pt 2**, 335-346

49. Schachter, J., Motta, A. P., de Souza Zamorano, A., da Silva-Souza, H. A., Guimaraes, M. Z., and Persechini, P. M. (2008) ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *Journal of cell science* **121**, 3261-3270

50. Faria, R. X., Defarias, F. P., and Alves, L. A. (2005) Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *American journal of physiology. Cell physiology* **288**, C260-271

51. Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., and Stojilkovic, S. S. (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* **63**, 641-683

52. Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* **19**, 571-582

53. Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A. H., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 861-869

54. Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M. T., Hsieh, G., Zhu, C. Z., Mikusa, J. P., Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D. M., Chandran, P., Harris, R., Medrano, A. P., Carroll, W., Marsh, K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R., and Jarvis, M. F. (2006) A-740003 [N-(1-{[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **319**, 1376-1385

55. Nelson, D. W., Gregg, R. J., Kort, M. E., Perez-Medrano, A., Voight, E. A., Wang, Y., Grayson, G., Namovic, M. T., Donnelly-Roberts, D. L., Niforatos, W., Honore, P., Jarvis, M. F., Faltynek, C. R., and Carroll, W. A. (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 3659-3666

56. Donnelly-Roberts, D. L., and Jarvis, M. F. (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *British journal of pharmacology* **151**, 571-579

57. Jarvis, M. F., and Khakh, B. S. (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**, 208-215

58. Skaper, S. D., Debetto, P., and Giusti, P. (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 337-345

59. Norenberg, W., Hempel, C., Urban, N., Sobottka, H., Illes, P., and Schaefer, M. (2011) Clemastine potentiates the human P2X7 receptor by sensitizing it to lower ATP concentrations. *The Journal of biological chemistry* **286**, 11067-11081

60. Norenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plotz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., and Schaefer, M. (2012) Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *British journal of pharmacology* **167**, 48-66

61. Gu, B. J., Rathsam, C., Stokes, L., McGeachie, A. B., and Wiley, J. S. (2009) Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *American journal of physiology. Cell physiology* **297**, C430-439

62. Roger, S., Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2008) Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 6393-6401

63. Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F., and Haag, F. (2002) Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* **169**, 4108-4112

64. Jindrichova, M., Bhattacharya, A., Rupert, M., Skopek, P., Obsil, T., and Zemkova, H. (2015) Functional characterization of mutants in the transmembrane domains of the rat P2X7 receptor that regulate pore conductivity and agonist sensitivity. *Journal of neurochemistry*

65. Gonnord, P., Delarasse, C., Auger, R., Benihoud, K., Prigent, M., Cuif, M. H., Lamaze, C., and Kanellopoulos, J. M. (2009) Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 795-805

66. (2012) *Purinergic signalling and the nervous system*, Springer, New York

67. Yan, Z., Khadra, A., Li, S., Tomic, M., Sherman, A., and Stojilkovic, S. S. (2010) Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 14213-14224

68. Marques-da-Silva, C., Chaves, M. M., Castro, N. G., Coutinho-Silva, R., and Guimaraes, M. Z. (2011) Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2

and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *British journal of pharmacology* **163**, 912-926

69. Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal* **25**, 5071-5082

70. Hanley, P. J., Kronlage, M., Kirschning, C., del Rey, A., Di Virgilio, F., Leipziger, J., Chessell, I. P., Sargin, S., Filippov, M. A., Lindemann, O., Mohr, S., Konigs, V., Schillers, H., Bahler, M., and Schwab, A. (2012) Transient P2X7 receptor activation triggers macrophage death independent of Toll-like receptors 2 and 4, caspase-1, and pannexin-1 proteins. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10650-10663

71. Rigato, C., Swinnen, N., Buckinx, R., Couillin, I., Mangin, J. M., Rigo, J. M., Legendre, P., and Le Corronc, H. (2012) Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 11559-11573

72. Ousingsawat, J., Wanitchakool, P., Kmit, A., Romao, A. M., Jantarajit, W., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2015) Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nature communications* **6**, 6245

73. Sun, C., Heid, M. E., Keyel, P. A., and Salter, R. D. (2013) The second transmembrane domain of P2X7 contributes to dilated pore formation. *PloS one* **8**, e61886

74. Tomasinsig, L., Pizzirani, C., Skerlavaj, B., Pellegatti, P., Gulinelli, S., Tossi, A., Di Virgilio, F., and Zanetti, M. (2008) The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **283**, 30471-30481

75. Jiang, L. H., Rassendren, F., Mackenzie, A., Zhang, Y. H., Surprenant, A., and North, R. A. (2005) N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors. *American journal of physiology. Cell physiology* **289**, C1295-1302

76. Woods, L. T., Camden, J. M., Batek, J. M., Petris, M. J., Erb, L., and Weisman, G. A. (2012) P2X7 receptor activation induces inflammatory responses in salivary gland epithelium. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, C790-801

77. Verhoef, P. A., Estacion, M., Schilling, W., and Dubyak, G. R. (2003) P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol* **170**, 5728-5738

78. Auger, R., Motta, I., Benihoud, K., Ojcius, D. M., and Kanellopoulos, J. M. (2005) A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *The Journal of biological chemistry* **280**, 28142-28151

79. Delarasse, C., Gonnord, P., Galante, M., Auger, R., Daniel, H., Motta, I., and Kanellopoulos, J. M. (2009) Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *Journal of neurochemistry* **109**, 846-857

80. Coutinho-Silva, R., Persechini, P. M., Bisaggio, R. D., Perfettini, J. L., Neto, A. C., Kanellopoulos, J. M., Motta-Ly, I., Dautry-Varsat, A., and Ojcius, D. M. (1999) P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *The American journal of physiology* **276**, C1139-1147

81. Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., and Golenbock, D. T. (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* **9**, 857-865

82. Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., and Latz, E. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* **9**, 847-856

83. Dostert, C., Guarda, G., Romero, J. F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., Suva, M. L., Stehle, J. C., Kopf, M., Stamenkovic, I., Corradin, G., and Tschopp, J. (2009) Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one* **4**, e6510

84. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221-225

85. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., and Choi, A. M. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* **12**, 222-230

86. Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., and Arditi, M. (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **36**, 401-414

87. Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* **180**, 7147-7157

88. Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L. L., Louie, S., Cupp, J. E., Dubyak, G. R., Hackos, D., and Dixit, V. M. (2011) Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* **186**, 6553-6561

89. Moncao-Ribeiro, L. C., Faffe, D. S., Santana, P. T., Vieira, F. S., da Graca, C. L., Marques-da-Silva, C., Machado, M. N., Caruso-Neves, C., Zin, W. A., Borojevic, R., Takiya,

C. M., and Coutinho-Silva, R. (2014) P2X7 receptor modulates inflammatory and functional pulmonary changes induced by silica. *PloS one* **9**, e110185

90. Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., and Couillin, I. (2012) ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell death & disease* **3**, e403

91. Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., and Di Virgilio, F. (2009) Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J Immunol* **182**, 4378-4385

92. Tschopp, J., and Schroder, K. (2010) NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature reviews. Immunology* **10**, 210-215

93. Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2009) NAD+ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* **182**, 2898-2908

94. Lin, C., Ren, S., Zhang, L., Jin, H., Sun, J., and Zuo, Y. (2012) Extracellular ATP induces CD44 shedding from macrophage-like P388D1 cells via the P2X7 receptor. *Hematological oncology* **30**, 70-75

95. Weskamp, G., Ford, J. W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A. J., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., Sehara-Fujisawa, A., Black, R. A., Ludwig, A., Becherer, J. D., Conrad, D. H., and Blobel, C. P. (2006) ADAM10 is a principal 'sheddase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nature immunology* **7**, 1293-1298

96. Pupovac, A., Geraghty, N. J., Watson, D., and Sluyter, R. (2015) Activation of the P2X7 receptor induces the rapid shedding of CD23 from human and murine B cells. *Immunology and cell biology* **93**, 77-85

97. Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W. L., Grahames, C. B., Casula, M. A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P., and Buell, G. N. (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **114**, 386-396

98. McGaraughty, S., Chu, K. L., Namovic, M. T., Donnelly-Roberts, D. L., Harris, R. R., Zhang, X. F., Shieh, C. C., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Gauvin, D. M., Fabiyi, A. C., Honore, P., Gregg, R. J., Kort, M. E., Nelson, D. W., Carroll, W. A., Marsh, K., Faltynek, C. R., and Jarvis, M. F. (2007) P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* **146**, 1817-1828

99. Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., and Di Virgilio, F. (1997) Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *The Journal of experimental medicine* **185**, 579-582

100. Sanz, J. M., and Di Virgilio, F. (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* **164**, 4893-4898

101. Parvathenani, L. K., Tertyshnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B., and Posmantur, R. (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13309-13317

102. McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G., and Choi, H. B. (2006) Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **65**, 1090-1097

103. Ryu, J. K., and McLarnon, J. G. (2008) Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport* **19**, 1715-1719

104. Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., and Gabel, C. A. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *The Journal of biological chemistry* **276**, 125-132

105. Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., Brissette, W., Wicks, J. R., Audoly, L., and Gabel, C. A. (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* **168**, 6436-6445

106. Portales-Cervantes, L., Nino-Moreno, P., Doniz-Padilla, L., Baranda-Candido, L., Garcia-Hernandez, M., Salgado-Bustamante, M., Gonzalez-Amaro, R., and Portales-Perez, D. (2010) Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Human immunology* **71**, 818-825

107. Al-Shukaili, A., Al-Kaabi, J., Hassan, B., Al-Araimi, T., Al-Tobi, M., Al-Kindi, M., Al-Maniri, A., Al-Gheilani, A., and Al-Ansari, A. (2011) P2X7 receptor gene polymorphism analysis in rheumatoid arthritis. *International journal of immunogenetics* **38**, 389-396

108. Nath, S. K., Quintero-Del-Rio, A. I., Kilpatrick, J., Feo, L., Ballesteros, M., and Harley, J. B. (2004) Linkage at 12q24 with systemic lupus erythematosus (SLE) is established and confirmed in Hispanic and European American families. *American journal of human genetics* **74**, 73-82

109. Elliott, J. I., McVey, J. H., and Higgins, C. F. (2005) The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis research & therapy* **7**, R468-475

110. Chen, L., and Brosnan, C. F. (2006) Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R-/- mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* **176**, 3115-3126

111. Taylor, S. R., Gonzalez-Begne, M., Sojka, D. K., Richardson, J. C., Sheardown, S. A., Harrison, S. M., Pusey, C. D., Tam, F. W., and Elliott, J. I. (2009) Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses. *Journal of leukocyte biology* **85**, 978-986

112. Witting, A., Chen, L., Cudaback, E., Straiker, A., Walter, L., Rickman, B., Moller, T., Brosnan, C., and Stella, N. (2006) Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6362-6367

113. Matute, C., Torre, I., Perez-Cerda, F., Perez-Samartin, A., Alberdi, E., Etxebarria, E., Arranz, A. M., Ravid, R., Rodriguez-Antiguedad, A., Sanchez-Gomez, M., and Domercq, M. (2007) P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 9525-9533

114. Gulbransen, B. D., Bashashati, M., Hirota, S. A., Gui, X., Roberts, J. A., MacDonald, J. A., Muruve, D. A., McKay, D. M., Beck, P. L., Mawe, G. M., Thompson, R. J., and Sharkey, K. A. (2012) Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nature medicine* **18**, 600-604

115. Kawamura, H., Aswad, F., Minagawa, M., Govindarajan, S., and Dennert, G. (2006) P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. *J Immunol* **176**, 2152-2160

116. Chen, Y. G., Scheuplein, F., Driver, J. P., Hewes, A. A., Reifsnyder, P. C., Leiter, E. H., and Serreze, D. V. (2011) Testing the role of P2X7 receptors in the development of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **186**, 4278-4284

117. Takeuchi, K., Kawashima, A., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1994) Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *Journal of cell science* **107 (Pt 7)**, 1921-1928

118. Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A., and Karplus, P. A. (2000) Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**, 259-270

119. Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M. (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends in cell biology* **9**, 187-192

120. Li, Q., Nance, M. R., Kulikauskas, R., Nyberg, K., Fehon, R., Karplus, P. A., Bretscher, A., and Tesmer, J. J. (2007) Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. *Journal of molecular biology* **365**, 1446-1459

121. Gary, R., and Bretscher, A. (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Molecular biology of the cell* **6**, 1061-1075

122. Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A., and Elias, L. (1998) Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7594-7603

123. Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of cell biology* **140**, 647-657

124. Clucas, J., and Valderrama, F. (2015) ERM proteins in cancer progression. *Journal of cell science* **128**, 1253

125. Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., and Carpen, O. (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **273**, 21893-21900

126. Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., and Tsukita, S. (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *The Journal of cell biology* **126**, 391-401

127. Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *The Journal of cell biology* **135**, 37-51

128. Ben-Aissa, K., Patino-Lopez, G., Belkina, N. V., Maniti, O., Rosales, T., Hao, J. J., Kruhlak, M. J., Knutson, J. R., Picart, C., and Shaw, S. (2012) Activation of moesin, a protein that links actin cytoskeleton to the plasma membrane, occurs by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding sequentially to two sites and releasing an autoinhibitory linker. *The Journal of biological chemistry* **287**, 16311-16323

129. Nakamura, F., Huang, L., Pestonjamasp, K., Luna, E. J., and Furthmayr, H. (1999) Regulation of F-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Molecular biology of the cell* **10**, 2669-2685

130. Belkina, N. V., Liu, Y., Hao, J. J., Karasuyama, H., and Shaw, S. (2009) LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4707-4712

131. Viswanatha, R., Ohouo, P. Y., Smolka, M. B., and Bretscher, A. (2012) Local phosphocycling mediated by LOK/SLK restricts ezrin function to the apical aspect of epithelial cells. *The Journal of cell biology* **199**, 969-984

132. Jeong, H. J., Kim, J. H., and Jeon, S. (2011) Amphetamine-induced ERM Proteins Phosphorylation Is through PKCbeta Activation in PC12 Cells. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* **15**, 245-249

133. Kim, H. S., Bae, C. D., and Park, J. (2010) Glutamate receptor-mediated phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins is implicated in filopodial protrusion of primary cultured hippocampal neuronal cells. *Journal of neurochemistry* **113**, 1565-1576

134. Kim, E. K., Park, J. M., Lim, S., Choi, J. W., Kim, H. S., Seok, H., Seo, J. K., Oh, K., Lee, D. S., Kim, K. T., Ryu, S. H., and Suh, P. G. (2011) Activation of AMP-activated protein kinase is essential for lysophosphatidic acid-induced cell migration in ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **286**, 24036-24045

135. Hebert, M., Potin, S., Sebbagh, M., Bertoglio, J., Breard, J., and Hamelin, J. (2008) Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* **181**, 5963-5973

136. Antoine-Bertrand, J., Ghogha, A., Luangrath, V., Bedford, F. K., and Lamarche-Vane, N. (2011) The activation of ezrin-radixin-moesin proteins is regulated by netrin-1 through Src kinase and RhoA/Rho kinase activities and mediates netrin-1-induced axon outgrowth. *Molecular biology of the cell* **22**, 3734-3746

137. Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1999) Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Current biology : CB* **9**, 1259-1262

138. Srivastava, J., Elliott, B. E., Louvard, D., and Arpin, M. (2005) Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling. *Molecular biology of the cell* **16**, 1481-1490

139. Crepaldi, T., Gautreau, A., Comoglio, P. M., Louvard, D., and Arpin, M. (1997) Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *The Journal of cell biology* **138**, 423-434

140. Canals, D., Roddy, P., and Hannun, Y. A. (2012) Protein phosphatase 1alpha mediates ceramide-induced ERM protein dephosphorylation: a novel mechanism independent of phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP2) and myosin/ERM phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10145-10155

141. Moyen, C., Goudenege, S., Poussard, S., Sassi, A. H., Brustis, J. J., and Cottin, P. (2004) Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 728-743

142. Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R., and Huttenlocher, A. (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature cell biology* **6**, 977-983

143. Knepper-Nicolai, B., Savill, J., and Brown, S. B. (1998) Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. *The Journal of biological chemistry* **273**, 30530-30536

144. Wang, H., Guo, Z., Wu, F., Long, F., Cao, X., Liu, B., Zhu, Z., and Yao, X. (2005) PKA-mediated protein phosphorylation protects ezrin from calpain I cleavage. *Biochemical and biophysical research communications* **333**, 496-501

145. Wald, F. A., Oriolo, A. S., Mashukova, A., Fregien, N. L., Langshaw, A. H., and Salas, P. J. (2008) Atypical protein kinase C (iota) activates ezrin in the apical domain of intestinal epithelial cells. *Journal of cell science* **121**, 644-654

146. Darmellah, A., Rayah, A., Auger, R., Cuif, M. H., Prigent, M., Arpin, M., Alcover, A., Delarasse, C., and Kanellopoulos, J. M. (2012) Ezrin/radixin/moesin are required for the purinergic P2X7 receptor (P2X7R)-dependent processing of the amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* **287**, 34583-34595

147. Zheng, S., Huang, J., Zhou, K., Zhang, C., Xiang, Q., Tan, Z., Wang, T., and Fu, X. (2011) 17beta-Estradiol enhances breast cancer cell motility and invasion via extra-nuclear activation of actin-binding protein ezrin. *PloS one* **6**, e22439

148. Rebillard, A., Jouan-Lanhouet, S., Jouan, E., Legembre, P., Pizon, M., Sergent, O., Gilot, D., Tekpli, X., Lagadic-Gossmann, D., and Dimanche-Boitrel, M. T. (2010) Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *Eur J Cancer* **46**, 1445-1455

149. Kishore, R., Qin, G., Luedemann, C., Bord, E., Hanley, A., Silver, M., Gavin, M., Yoon, Y. S., Goukassian, D., and Losordo, D. W. (2005) The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF-alpha-induced transcriptional repression of cyclin A. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1785-1796

150. Tran Quang, C., Gautreau, A., Arpin, M., and Treisman, R. (2000) Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *The EMBO journal* **19**, 4565-4576

151. Huang, H., Xiao, Y., Lin, H., Fu, D., Zhan, Z., Liang, L., Yang, X., Fan, J., Ye, Y., Sun, L., and Xu, H. (2011) Increased phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins contributes to proliferation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* **50**, 1045-1053

152. Wang, Q., Pfeiffer, G. R., 2nd, and Gaarde, W. A. (2003) Activation of SRC tyrosine kinases in response to ICAM-1 ligation in pulmonary microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 47731-47743

153. Autero, M., Heiska, L., Ronnstrand, L., Vaheri, A., Gahmberg, C. G., and Carpen, O. (2003) Ezrin is a substrate for Lck in T cells. *FEBS letters* **535**, 82-86

154. Zhou, R., Cao, X., Watson, C., Miao, Y., Guo, Z., Forte, J. G., and Yao, X. (2003) Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 35651-35659

155. Milewski, M. I., Mickle, J. E., Forrest, J. K., Stafford, D. M., Moyer, B. D., Cheng, J., Guggino, W. B., Stanton, B. A., and Cutting, G. R. (2001) A PDZ-binding motif is essential but not sufficient to localize the C terminus of CFTR to the apical membrane. *Journal of cell science* **114**, 719-726

156. Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *The Journal of cell biology* **140**, 885-895

157. Reczek, D., Berryman, M., and Bretscher, A. (1997) Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *The Journal of cell biology* **139**, 169-179

158. Reczek, D., and Bretscher, A. (1998) The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *The Journal of biological chemistry* **273**, 18452-18458

159. Terawaki, S., Maesaki, R., and Hakoshima, T. (2006) Structural basis for NHERF recognition by ERM proteins. *Structure* **14**, 777-789

160. Reczek, D., and Bretscher, A. (2001) Identification of EPI64, a TBC/rabGAP domain-containing microvillar protein that binds to the first PDZ domain of EBP50 and E3KARP. *The Journal of cell biology* **153**, 191-206

161. Cha, B., Tse, M., Yun, C., Kovbasnjuk, O., Mohan, S., Hubbard, A., Arpin, M., and Donowitz, M. (2006) The NHE3 juxtamembrane cytoplasmic domain directly binds ezrin: dual role in NHE3 trafficking and mobility in the brush border. *Molecular biology of the cell* **17**, 2661-2673

162. Naba, A., Reverdy, C., Louvard, D., and Arpin, M. (2008) Spatial recruitment and activation of the Fes kinase by ezrin promotes HGF-induced cell scattering. *The EMBO journal* **27**, 38-50

163. Gautreau, A., Poullet, P., Louvard, D., and Arpin, M. (1999) Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7300-7305

164. Serrador, J. M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. (1998) CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* **91**, 4632-4644

165. Ivetic, A., Deka, J., Ridley, A., and Ager, A. (2002) The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of Moesin but not Ezrin. *The Journal of biological chemistry* **277**, 2321-2329

166. Killock, D. J., Parsons, M., Zarrouk, M., Ameer-Beg, S. M., Ridley, A. J., Haskard, D. O., Zvelebil, M., and Ivetic, A. (2009) In Vitro and in Vivo Characterization of Molecular Interactions between Calmodulin, Ezrin/Radixin/Moesin, and L-selectin. *The Journal of biological chemistry* **284**, 8833-8845

167. Serrador, J. M., Urzainqui, A., Alonso-Lebrero, J. L., Cabrero, J. R., Montoya, M. C., Vicente-Manzanares, M., Yanez-Mo, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002) A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes. *European journal of immunology* **32**, 1560-1566

168. Dominguez-Luis, M., Lamana, A., Vazquez, J., Garcia-Navas, R., Mollinedo, F., Sanchez-Madrid, F., Diaz-Gonzalez, F., and Urzainqui, A. (2011) The metalloprotease ADAM8 is associated with and regulates the function of the adhesion receptor PSGL-1 through ERM proteins. *European journal of immunology* **41**, 3436-3442

169. Cheng, L., Itoh, K., and Lemmon, V. (2005) L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 395-403

170. Serrador, J. M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F., and Sanchez-Madrid, F. (1997) Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *The Journal of cell biology* **138**, 1409-1423

171. Saotome, I., Curto, M., and McClatchey, A. I. (2004) Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Developmental cell* **6**, 855-864

172. Tamura, A., Kikuchi, S., Hata, M., Katsuno, T., Matsui, T., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005) Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical canaliculi in gastric parietal cells. *The Journal of cell biology* **169**, 21-28

173. Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2002) Radixin deficiency causes

conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nature genetics* **31**, 320-325

174. Kitajiri, S., Fukumoto, K., Hata, M., Sasaki, H., Katsuno, T., Nakagawa, T., Ito, J., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2004) Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *The Journal of cell biology* **166**, 559-570

175. Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (1999) Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *The Journal of biological chemistry* **274**, 2315-2321

176. Ivetic, A., Florey, O., Deka, J., Haskard, D. O., Ager, A., and Ridley, A. J. (2004) Mutagenesis of the ezrin-radixin-moesin binding domain of L-selectin tail affects shedding, microvillar positioning, and leukocyte tethering. *The Journal of biological chemistry* **279**, 33263-33272

177. Fievet, B., Louvard, D., and Arpin, M. (2007) ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 653-660

178. Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D., and Cotecchia, S. (2006) Ezrin directly interacts with the alpha1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. *The Journal of biological chemistry* **281**, 4354-4363

179. Zhao, H., Shiue, H., Palkon, S., Wang, Y., Cullinan, P., Burkhardt, J. K., Musch, M. W., Chang, E. B., and Turner, J. R. (2004) Ezrin regulates NHE3 translocation and activation after Na+-glucose cotransport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9485-9490

180. Shiue, H., Musch, M. W., Wang, Y., Chang, E. B., and Turner, J. R. (2005) Akt2 phosphorylates ezrin to trigger NHE3 translocation and activation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1688-1695

181. Swiatecka-Urban, A., Duhaime, M., Coutermarsh, B., Karlson, K. H., Collawn, J., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Langford, G., and Stanton, B. A. (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry* **277**, 40099-40105

182. Cant, S. H., and Pitcher, J. A. (2005) G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* **16**, 3088-3099

183. Ng, T., Parsons, M., Hughes, W. E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P. J., Bastiaens, P. I., and Parker, P. J. (2001) Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *The EMBO journal* **20**, 2723-2741

184. Legg, J. W., Lewis, C. A., Parsons, M., Ng, T., and Isacke, C. M. (2002) A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nature cell biology* **4**, 399-407

185. Castelo, L., and Jay, D. G. (1999) Radixin is involved in lamellipodial stability during nerve growth cone motility. *Molecular biology of the cell* **10**, 1511-1520

186. Roubinet, C., Decelle, B., Chicanne, G., Dorn, J. F., Payrastre, B., Payre, F., and Carreno, S. (2011) Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *The Journal of cell biology* **195**, 99-112

187. Fackler, O. T., and Grosse, R. (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *The Journal of cell biology* **181**, 879-884

188. Elliott, B. E., Meens, J. A., SenGupta, S. K., Louvard, D., and Arpin, M. (2005) The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast cancer research : BCR* **7**, R365-373

189. Gavert, N., Ben-Shmuel, A., Lemmon, V., Brabletz, T., and Ben-Ze'ev, A. (2010) Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells. *Journal of cell science* **123**, 2135-2143

190. Charrin, S., and Alcover, A. (2006) Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **11**, 1987-1997

191. Roumier, A., Olivo-Marin, J. C., Arpin, M., Michel, F., Martin, M., Mangeat, P., Acuto, O., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2001) The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* **15**, 715-728

192. Shaffer, M. H., Dupree, R. S., Zhu, P., Saotome, I., Schmidt, R. F., McClatchey, A. I., Freedman, B. D., and Burkhardt, J. K. (2009) Ezrin and moesin function together to promote T cell activation. *J Immunol* **182**, 1021-1032

193. Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K., and Sperling, A. I. (2001) ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* **15**, 739-750

194. Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R. N. (2001) Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* **15**, 691-701

195. Trofatter, J. A., MacCollin, M. M., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Duyao, M. P., Parry, D. M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A. G., Pulaski, K., and et al. (1993) A novel moesin-,

ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* **72**, 791-800

196. Rouleau, G. A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B., and et al. (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* **363**, 515-521

197. Pykett, M. J., Murphy, M., Harnish, P. R., and George, D. L. (1994) The neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor gene encodes multiple alternatively spliced transcripts. *Human molecular genetics* **3**, 559-564

198. Sivakumar, K. C., Thomas, B., and Karunagaran, D. (2009) Three dimensional structure of the closed conformation (active) of human merlin reveals masking of actin binding site in the FERM domain. *International journal of bioinformatics research and applications* **5**, 516-524

199. Jin, H., Sperka, T., Herrlich, P., and Morrison, H. (2006) Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* **442**, 576-579

200. Orian-Rousseau, V. (2003) CD44 involvement as a regulator of cell proliferation. *M S-Med Sci* **19**, 405-407

201. Gronholm, M., Sainio, M., Zhao, F., Heiska, L., Vaheri, A., and Carpen, O. (1999) Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin. *Journal of cell science* **112 (Pt 6)**, 895-904

202. Neill, G. W., and Crompton, M. R. (2001) Binding of the merlin-I product of the neurofibromatosis type 2 tumour suppressor gene to a novel site in beta-fodrin is regulated by association between merlin domains. *The Biochemical journal* **358**, 727-735

203. Jannatipour, M., Dion, P., Khan, S., Jindal, H., Fan, X., Laganiere, J., Chishti, A. H., and Rouleau, G. A. (2001) Schwannomin isoform-1 interacts with syntenin via PDZ domains. *The Journal of biological chemistry* **276**, 33093-33100

204. Huang, J., and Chen, J. (2008) VprBP targets Merlin to the Roc1-Cul4A-DDB1 E3 ligase complex for degradation. *Oncogene* **27**, 4056-4064

205. Morrow, K. A., and Shevde, L. A. (2012) Merlin: the wizard requires protein stability to function as a tumor suppressor. *Biochimica et biophysica acta* **1826**, 400-406

206. Novak, U. (2004) ADAM proteins in the brain. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **11**, 227-235

207. Groblewska, M., Siewko, M., Mroczko, B., and Szmitkowski, M. (2012) The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of

esophageal cancer. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* **50**, 12-19

208. Edwards, D. R., Handsley, M. M., and Pennington, C. J. (2008) The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine* **29**, 258-289

209. Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., and Black, R. A. (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* **275**, 14608-14614

210. Kuno, K., Iizasa, H., Ohno, S., and Matsushima, K. (1997) The exon/intron organization and chromosomal mapping of the mouse ADAMTS-1 gene encoding an ADAM family protein with TSP motifs. *Genomics* **46**, 466-471

211. Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L., and Edwards, D. R. (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *The Biochemical journal* **386**, 15-27

212. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733

213. Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D., and et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385**, 733-736

214. Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., and Glynn, P. (1996) Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *The Biochemical journal* **317 (Pt 1)**, 45-50

215. Zhang, Z., Oliver, P., Lancaster, J. R., Jr., Schwarzenberger, P. O., Joshi, M. S., Cork, J., and Kolls, J. K. (2001) Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 303-305

216. Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., and Pandiella, A. (2002) Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Molecular biology of the cell* **13**, 2031-2044

217. Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W., and Murphy, G. (2005) ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of cell science* **118**, 2371-2380

218. Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D., Niu, X. D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., and Blobel, C. P. (2010) ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *Journal of cell science* **123**, 3913-3922

219. Yan, Y., Shirakabe, K., and Werb, Z. (2002) The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *The Journal of cell biology* **158**, 221-226

220. Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Le Naour, F. (2008) Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol* **181**, 7002-7013

221. Xu, D., Sharma, C., and Hemler, M. E. (2009) Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3674-3681

222. Dornier, E., Coumailleau, F., Ottavi, J. F., Moretti, J., Boucheix, C., Mauduit, P., Schweisguth, F., and Rubinstein, E. (2012) TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals. *The Journal of cell biology* **199**, 481-496

223. McIlwain, D. R., Lang, P. A., Maretzky, T., Hamada, K., Ohishi, K., Maney, S. K., Berger, T., Murthy, A., Duncan, G., Xu, H. C., Lang, K. S., Haussinger, D., Wakeham, A., Itie-Youten, A., Khokha, R., Ohashi, P. S., Blobel, C. P., and Mak, T. W. (2012) iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS. *Science* **335**, 229-232

224. Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., Taylor, N., and Freeman, M. (2012) Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* **335**, 225-228

225. Maretzky, T., McIlwain, D. R., Issuree, P. D., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P. A., Mak, T. W., and Blobel, C. P. (2013) iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 11433-11438

226. Mohammed, F. F., Smookler, D. S., Taylor, S. E., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O. H., English, J. L., Matrisian, L. M., Au, B., Yeh, W. C., and Khokha, R. (2004) Abnormal TNF activity in Timp3-/- mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nature genetics* **36**, 969-977

227. Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J. W., Palmisano, R., and Zhou, P. (2007) The

ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *The Journal of biological chemistry* **282**, 35712-35721

228. Le Gall, S. M., Bobe, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X. D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., and Blobel, C. P. (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Molecular biology of the cell* **20**, 1785-1794

229. Karkkainen, I., Rybnikova, E., Pelto-Huikko, M., and Huovila, A. P. (2000) Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Molecular and cellular neurosciences* **15**, 547-560

230. Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F., and Fahrenholz, F. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1456-1464

231. Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R., and Okano, H. (2000) The bHLH gene hes1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 283-293

232. Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P., and Reiss, K. (2005) L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Molecular and cellular biology* **25**, 9040-9053

233. Doherty, P., Williams, E., and Walsh, F. S. (1995) A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron* **14**, 57-66

234. Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O. A., Huang, Q., Shou, W., Rich, J. N., and Bao, S. (2011) L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *The EMBO journal* **30**, 800-813

235. Matthews, V., Schuster, B., Schutze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K. J., and Rose-John, S. (2003) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Journal of biological chemistry* **278**, 38829-38839

236. Fratiglioni, L., Viitanen, M., vonStrauss, E., Tontodonati, V., Herlitz, A., and Winblad, B. (1997) Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: Incidence data from the Kungsholmen project, Stockholm. *Neurology* **48**, 132-138

237. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications* **120**, 885-890

238. Brion, J. P., Flament-Durand, J., and Dustin, P. (1986) Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet* **2**, 1098

239. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 4913-4917

240. Flament, S., and Delacourte, A. (1989) Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS letters* **247**, 213-216

241. Oda, T., Wals, P., Osterburg, H. H., Johnson, S. A., Pasinetti, G. M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Stine, W. B., Snyder, S. W., Holzman, T. F., and et al. (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Experimental neurology* **136**, 22-31

242. Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fievet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., de Pancorbo, M. M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossu, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanche, H., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., and Amouyel, P. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics* **41**, 1094-1099

243. Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K. S., Passmore, P. A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A. D., Love, S., Kehoe, P. G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Schurmann, B., Heun, R., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frolich, L., Hampel, H., Hull, M., Rujescu, D., Goate, A. M., Kauwe, J. S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J. C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P. P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N. J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Tsolaki, M., Singleton, A. B., Guerreiro, R., Muhleisen, T. W., Nothen, M. M., Moebus, S., Jockel, K. H., Klopp, N., Wichmann, H. E., Carrasquillo, M. M., Pankratz, V. S., Younkin, S. G., Holmans, P. A., O'Donovan, M., Owen, M. J., and Williams, J. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics* **41**, 1088-1093

244. Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., Destefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., Vardarajan, B. N., Kamatani, Y., Lin, C. F., Gerrish, A., Schmidt, H., Kunkle, B., Dunstan, M. L., Ruiz, A., Bihoreau, M. T., Choi, S. H., Reitz, C., Pasquier, F., Hollingworth, P., Ramirez, A., Hanon, O., Fitzpatrick, A. L., Buxbaum, J. D., Campion, D., Crane, P. K., Baldwin, C., Becker, T., Gudnason, V., Cruchaga, C., Craig, D., Amin, N., Berr, C., Lopez, O. L., De Jager, P. L., Deramecourt, V., Johnston, J. A., Evans, D., Lovestone, S., Letenneur, L., Moron, F. J., Rubinsztein, D. C., Eiriksdottir, G., Sleegers, K., Goate, A. M., Fievet, N., Huentelman, M. J., Gill, M., Brown, K., Kamboh, M. I., Keller, L., Barberger-Gateau, P., McGuinness, B., Larson, E. B., Green, R., Myers, A. J., Dufouil, C., Todd, S., Wallon, D., Love, S., Rogaeva, E., Gallacher, J., St George-Hyslop, P., Clarimon, J., Lleo, A., Bayer, A., Tsuang, D. W., Yu, L., Tsolaki, M., Bossu, P., Spalletta, G., Proitsi, P., Collinge, J., Sorbi, S., Sanchez-Garcia, F., Fox, N. C., Hardy, J., Naranjo, M. C., Bosco, P., Clarke, R., Brayne, C., Galimberti, D., Mancuso, M., Matthews, F., Moebus, S., Mecocci, P., Del Zompo, M., Maier, W., Hampel, H., Pilotto, A., Bullido, M., Panza, F., Caffarra, P., Nacmias, B., Gilbert, J. R., Mayhaus, M., Lannfelt, L., Hakonarson, H., Pichler, S., Carrasquillo, M. M., Ingelsson, M., Beekly, D., Alvarez, V., Zou, F., Valladares, O., Younkin, S. G., Coto, E., Hamilton-Nelson, K. L., Gu, W., Razquin, C., Pastor, P., Mateo, I., Owen, M. J., Faber, K. M., Jonsson, P. V., Combarros, O., O'Donovan, M. C., Cantwell, L. B., Soininen, H., Blacker, D., Mead, S., Mosley, T. H., Jr., Bennett, D. A., Harris, T. B., Fratiglioni, L., Holmes, C., de Bruijn, R. F., Passmore, P., Montine, T. J., Bettens, K., Rotter, J. I., Brice, A., Morgan, K., Foroud, T. M., Kukull, W. A., Hannequin, D., Powell, J. F., Nalls, M. A., Ritchie, K., Lunetta, K. L., Kauwe, J. S., Boerwinkle, E., Riemenschneider, M., Boada, M., Hiltunen, M., Martin, E. R., Schmidt, R., Rujescu, D., Wang, L. S., Dartigues, J. F., Mayeux, R., Tzourio, C., Hofman, A., Nothen, M. M., Graff, C., Psaty, B. M., Jones, L., Haines, J. L., Holmans, P. A., Lathrop, M., Pericak-Vance, M. A., Launer, L. J., Farrer, L. A., van Duijn, C. M., Van Broeckhoven, C., Moskvina, V., Seshadri, S., Williams, J., Schellenberg, G. D., and Amouyel, P. (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics*

245. Duyckaerts, C., Hauw, J. J., Piette, F., Rainsard, C., Poulain, V., Berthaux, P., and Escourolle, R. (1985) Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta neuropathologica* **66**, 72-74

246. Dhenain, M., Lehericy, S., and Duyckaerts, C. (2002) Diagnosis: from neuropathology to neuroimagery. *M S-Med Sci* **18**, 697-708

247. Querfurth, H. W., and LaFerla, F. M. (2010) Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **362**, 329-344

248. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **21**, 383-421

249. Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., and Golenbock, D. T. (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* **493**, 674-678

250. Delaere, P., He, Y., Fayet, G., Duyckaerts, C., and Hauw, J. J. (1993) Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiology of aging* **14**, 191-194

251. Philipson, O., Lord, A., Lalowski, M., Soliymani, R., Baumann, M., Thyberg, J., Bogdanovic, N., Olofsson, T., Tjernberg, L. O., Ingelsson, M., Lannfelt, L., Kalimo, H., and Nilsson, L. N. (2012) The Arctic amyloid-beta precursor protein (AbetaPP) mutation results in distinct plaques and accumulation of N- and C-truncated Abeta. *Neurobiology of aging* **33**, 1010 e1011-1013

252. Epis, R., Marcello, E., Gardoni, F., Vastagh, C., Malinverno, M., Balducci, C., Colombo, A., Borroni, B., Vara, H., Dell'Agli, M., Cattabeni, F., Giustetto, M., Borsello, T., Forloni, G., Padovani, A., and Di Luca, M. (2010) Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* **133**, 3323-3335

253. Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., and LaFerla, F. M. (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **24**, 1063-1070

254. Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356

255. Bhattacharyya, R., Barren, C., and Kovacs, D. M. (2013) Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 11169-11183

256. Guo, Q., Wang, Z., Li, H., Wiese, M., and Zheng, H. (2012) APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell research* **22**, 78-89

257. Young-Pearse, T. L., Suth, S., Luth, E. S., Sawa, A., and Selkoe, D. J. (2010) Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 10431-10440

258. Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., LoTurco, J. J., and Selkoe, D. J. (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 14459-14469

259. Rice, H. C., Townsend, M., Bai, J., Suth, S., Cavanaugh, W., Selkoe, D. J., and Young-Pearse, T. L. (2012) Pancortins interact with amyloid precursor protein and modulate cortical cell migration. *Development* **139**, 3986-3996

260. Akaaboune, M., Allinquant, B., Farza, H., Roy, K., Magoul, R., Fiszman, M., Festoff, B. W., and Hantai, D. (2000) Developmental regulation of amyloid precursor protein at the neuromuscular junction in mouse skeletal muscle. *Molecular and cellular neurosciences* **15**, 355-367

261. Narindrasorasak, S., Lowery, D. E., Altman, R. A., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Greenberg, B. D., and Kisilevsky, R. (1992) Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **67**, 643-652

262. Beher, D., Hesse, L., Masters, C. L., and Multhaup, G. (1996) Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *The Journal of biological chemistry* **271**, 1613-1620

263. Breen, K. C., Bruce, M., and Anderton, B. H. (1991) Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *Journal of neuroscience research* **28**, 90-100

264. Yoshikawa, K. (2000) [Molecular mechanisms of differentiation and death of human neurons: with special reference to necdin and APP]. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi = Japanese journal of psychopharmacology* **20**, 155-159

265. Thathiah, A., and De Strooper, B. (2011) The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **12**, 73-87

266. Ni, Y., Zhao, X., Bao, G., Zou, L., Teng, L., Wang, Z., Song, M., Xiong, J., Bai, Y., and Pei, G. (2006) Activation of beta2-adrenergic receptor stimulates gamma-secretase activity and accelerates amyloid plaque formation. *Nature medicine* **12**, 1390-1396

267. Kojro, E., Postina, R., Buro, C., Meiringer, C., Gehrig-Burger, K., and Fahrenholz, F. (2006) The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 512-514

268. Rat, D., Schmitt, U., Tippmann, F., Dewachter, I., Theunis, C., Wieczerzak, E., Postina, R., van Leuven, F., Fahrenholz, F., and Kojro, E. (2011) Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 3208-3218

269. Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J. L., Fischmeister, R., and Lezoualc'h, F. (2003) Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. *Nature cell biology* **5**, 633-639

270. Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., Dumuis, A., and Claeysen, S. (2013) 5-HT4 receptors constitutively promote the non-amyloidogenic pathway of APP cleavage and interact with ADAM10. *ACS chemical neuroscience* **4**, 130-140

271. Camden, J. M., Schrader, A. M., Camden, R. E., Gonzalez, F. A., Erb, L., Seye, C. I., and Weisman, G. A. (2005) P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *The Journal of biological chemistry* **280**, 18696-18702

272. Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B., and Kanellopoulos, J. M. (2011) The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase dependent processing of the amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* **286**, 2596-2606

273. Kong, Q., Peterson, T. S., Baker, O., Stanley, E., Camden, J., Seye, C. I., Erb, L., Simonyi, A., Wood, W. G., Sun, G. Y., and Weisman, G. A. (2009) Interleukin-1beta enhances nucleotide-induced and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y(2) receptor. *Journal of neurochemistry* **109**, 1300-1310

274. Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002) A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* **41**, 2825-2835

275. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3922-3927

276. Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochemical and biophysical research communications* **301**, 231-235

277. Peiretti, F., Canault, M., Morange, P., Alessi, M. C., and Nalbone, G. (2009) [The two sides of ADAM17 in inflammation: implications in atherosclerosis and obesity]. *Medecine sciences : M/S* **25**, 45-50

278. Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *The Biochemical journal* **343 Pt 2**, 371-375

279. Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2002) A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochemical and biophysical research communications* **293**, 800-805

280. Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., Annaert, W., Saftig, P., Hartmann, D., and De Strooper, B. (2009) ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *The Journal of biological chemistry* **284**, 11738-11747

281. Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., and Christie, G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and cellular neurosciences* **14**, 419-427

282. Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., and John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-540

283. Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., and Gurney, M. E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533-537

284. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1456-1460

285. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741

286. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nature neuroscience* **4**, 233-234

287. Creemers, J. W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001) Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *The Journal of biological chemistry* **276**, 4211-4217

288. Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., and Vassar, R. (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *The Journal of biological chemistry* **275**, 37712-37717

289. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *The Journal of biological chemistry* **275**, 33729-33737

290. Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2002) Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *The Journal of biological chemistry* **277**, 16278-16284

291. Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature neuroscience* **4**, 231-232

292. Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664-666

293. Savonenko, A. V., Melnikova, T., Laird, F. M., Stewart, K. A., Price, D. L., and Wong, P. C. (2008) Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5585-5590

294. Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S., and Taramelli, R. (2000) The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS letters* **468**, 59-64

295. Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G., and Xu, H. (2003) PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 7850-7854

296. Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K., and Beyreuther, K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nature medicine* **3**, 1016-1020

297. Serneels, L., Dejaegere, T., Craessaerts, K., Horre, K., Jorissen, E., Tousseyn, T., Hebert, S., Coolen, M., Martens, G., Zwijsen, A., Annaert, W., Hartmann, D., and De Strooper, B. (2005) Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1719-1724

298. Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horre, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M. K., Berezovska, O., Hyman, B. T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., May, P. C., Karran, E., Wiltfang, J., D'Hooge, R., and De Strooper, B. (2009) gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* **324**, 639-642

299. Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001) Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *The Journal of biological chemistry* **276**, 35235-35238

300. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO reports* **2**, 835-841

301. Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen, A., Segers-Nolten, I., Van Der Werf, K., Subramaniam, V., Braeken, D., Callewaert, G., Bartic, C., D'Hooge, R., Martins, I. C., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and De Strooper, B. (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *The EMBO journal* **29**, 3408-3420

302. Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* **81**, 741-766

303. Youssef, I., Florent-Bechard, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Bihain, B., Olivier, J. L., Leininger-Muller, B., Kriem, B., Oster, T., and Pillot, T. (2008) N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiology of aging* **29**, 1319-1333

304. Muller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology* **85**, 393-406

305. Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J. G., Barger, S. W., Mrak, R. E., and Griffin, W. S. (2000) Neuronal-glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 149-155

306. Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D., and Tessier-Lavigne, M. (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**, 981-989

307. Roch, J. M., Masliah, E., Roch-Levecq, A. C., Sundsmo, M. P., Otero, D. A., Veinbergs, I., and Saitoh, T. (1994) Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7450-7454

308. Bell, K. F., Zheng, L., Fahrenholz, F., and Cuello, A. C. (2008) ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiology of aging* **29**, 554-565

309. Sugaya, K. (2008) Mechanism of glial differentiation of neural progenitor cells by amyloid precursor protein. *Neuro-degenerative diseases* **5**, 170-172

310. Kwak, Y. D., Marutle, A., Dantuma, E., Merchant, S., Bushnev, S., and Sugaya, K. (2011) Involvement of notch signaling pathway in amyloid precursor protein induced glial differentiation. *European journal of pharmacology* **650**, 18-27

311. Demars, M. P., Bartholomew, A., Strakova, Z., and Lazarov, O. (2011) Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin. *Stem cell research & therapy* **2**, 36

312. Gralle, M., Botelho, M. G., and Wouters, F. S. (2009) Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *The Journal of biological chemistry* **284**, 15016-15025

313. Obregon, D., Hou, H., Deng, J., Giunta, B., Tian, J., Darlington, D., Shahaduzzaman, M., Zhu, Y., Mori, T., Mattson, M. P., and Tan, J. (2012) Soluble amyloid precursor protein-alpha modulates beta-secretase activity and amyloid-beta generation. *Nature communications* **3**, 777

314. Hartl, D., Klatt, S., Roch, M., Konthur, Z., Klose, J., Willnow, T. E., and Rohe, M. (2013) Soluble alpha-APP (sAPPalpha) regulates CDK5 expression and activity in neurons. *PloS one* **8**, e65920

315. Wilson, H. L., Wilson, S. A., Surprenant, A., and North, R. A. (2002) Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *The Journal of biological chemistry* **277**, 34017-34023

316. Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B., and Kanellopoulos, J. M. (2011) The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* **286**, 2596-2606

317. Suh, J., Choi, S. H., Romano, D. M., Gannon, M. A., Lesinski, A. N., Kim, D. Y., and Tanzi, R. E. (2013) ADAM10 missense mutations potentiate beta-amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron* **80**, 385-401

318. Weinman, E. J., Hall, R. A., Friedman, P. A., Liu-Chen, L. Y., and Shenolikar, S. (2006) The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annual review of physiology* **68**, 491-505

319. Bai, Y., Liu, Y. J., Wang, H., Xu, Y., Stamenkovic, I., and Yu, Q. (2007) Inhibition of the hyaluronan-CD44 interaction by merlin contributes to the tumor-suppressor activity of merlin. *Oncogene* **26**, 836-850

320. Hartmann, M., Parra, L. M., Ruschel, A., Bohme, S., Li, Y., Morrison, H., Herrlich, A., and Herrlich, P. (2015) Tumor Suppressor NF2 Blocks Cellular Migration by Inhibiting Ectodomain Cleavage of CD44. *Molecular cancer research : MCR* **13**, 879-890

321. Hartmann, M., Parra, L. M., Ruschel, A., Lindner, C., Morrison, H., Herrlich, A., and Herrlich, P. (2015) Inside-out Regulation of Ectodomain Cleavage of Cluster-of-Differentiation-44 (CD44) and of Neuregulin-1 Requires Substrate Dimerization. *The Journal of biological chemistry* **290**, 17041-17054

322. Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C. A., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Milhiet, P. E. (2008) Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *The Journal of cell biology* **182**, 765-776

323. Conacci-Sorrell, M., Kaplan, A., Raveh, S., Gavert, N., Sakurai, T., and Ben-Ze'ev, A. (2005) The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer research* **65**, 11605-11612

324. Davis, J. Q., Lambert, S., and Bennett, V. (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *The Journal of cell biology* **135**, 1355-1367

325. Killock, D. J., and Ivetic, A. (2010) The cytoplasmic domains of TNFalpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *The Biochemical journal* **428**, 293-304

326. Leon-Otegui, M., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, J. I., Diaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M. T., and Gualix, J. (2011) Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on alpha-secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS letters* **585**, 2255-2262

327. Diaz-Hernandez, J. I., Gomez-Villafuertes, R., Leon-Otegui, M., Hontecillas-Prieto, L., Del Puerto, A., Trejo, J. L., Lucas, J. J., Garrido, J. J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T., and Diaz-Hernandez, M. (2012) In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiology of aging* **33**, 1816-1828

328. Ni, J., Wang, P., Zhang, J., Chen, W., and Gu, L. (2013) Silencing of the P2X(7) receptor enhances amyloid-beta phagocytosis by microglia. *Biochemical and biophysical research communications* **434**, 363-369

329. Ortega, F., Perez-Sen, R., Morente, V., Delicado, E. G., and Miras-Portugal, M. T. (2010) P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, 1723-1733

330. Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 1-7

331. Sabelko-Downes, K. A., Cross, A. H., and Russell, J. H. (1999) Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* **189**, 1195-1205

332. Sabelko-Downes, K. A., Russell, J. H., and Cross, A. H. (1999) Role of Fas--FasL interactions in the pathogenesis and regulation of autoimmune demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology* **100**, 42-52

333. Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C. P. (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *The Journal of cell biology* **164**, 769-779

334. Hart, S., Fischer, O. M., Prenzel, N., Zwick-Wallasch, E., Schneider, M., Hennighausen, L., and Ullrich, A. (2005) GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways. *Biological chemistry* **386**, 845-855

335. Zhang, Q., Thomas, S. M., Lui, V. W., Xi, S., Siegfried, J. M., Fan, H., Smithgall, T. E., Mills, G. B., and Grandis, J. R. (2006) Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6901-6906

336. Kataoka, H. (2009) EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *Journal of dermatological science* **56**, 148-153

337. Zaiss, D. M., Gause, W. C., Osborne, L. C., and Artis, D. (2015) Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity* **42**, 216-226

338. Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C., and Mathis, D. (2013) A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* **155**, 1282-1295

339. Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., and Adriouch, S. (2011) Extracellular NAD+ shapes the Foxp3+ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2561-2568

340. Zaiss, D. M., van Loosdregt, J., Gorlani, A., Bekker, C. P., Grone, A., Sibilia, M., van Bergen en Henegouwen, P. M., Roovers, R. C., Coffer, P. J., and Sijts, A. J. (2013) Amphiregulin enhances regulatory T cell-suppressive function via the epidermal growth factor receptor. *Immunity* **38**, 275-284

341. Morrissey, P. J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D., and Watson, J. D. (1993) CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into

congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **178**, 237-244

342. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* **1**, 553-562

343. Shale, M., Schiering, C., and Powrie, F. (2013) CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunological reviews* **252**, 164-182

ANNEXE

ELSEVIER

Institut Pasteur

Microbes and Infection 14 (2012) 1254–1262

www.elsevier.com/locate/micinf

P2 receptors and immunity

Amel Rayah [a], Jean M. Kanellopoulos [a], Francesco Di Virgilio [b,*]

[a] *Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France*
[b] *Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of General Pathology, University of Ferrara, Via Borsari 46, Ferrara I-44121, Italy*

Received 7 May 2012; accepted 2 July 2012
Available online 13 August 2012

Abstract

Immune cells express receptors for extracellular nucleotides named P2 receptors. P2 receptors transduce signals delivered by nucleotides present in the extracellular environment. Accruing evidence shows that purinergic signalling has a profound effect on multiple immune cell responses such as T lymphocyte proliferation, chemotaxis, cytokine release, phagocytosis, Ag presentation and cytotoxicity. This makes P2 receptors an attractive target for the therapy of immuno-mediated disease and cancer.
© 2012 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Nucleotides; Adenosine triphosphate; Damage associated molecular patterns (DAMP); Purinergic receptors; Inflammasome; Autoimmune diseases

1. Nucleotides as extracellular messengers

Adenosine triphosphate (ATP) is probably one of the oldest signalling molecules appeared during evolution of living organisms. Albeit it is basically impossible to gather experimental proofs, it would not be surprising that ATP was used as a signalling molecules at the same time as it started to be exploited as an intracellular energy source. There are several reports of the activity of extracellular ATP in primitive organisms such as bacteria, algae and slime moulds [1]. Evidence for a signalling role of extracellular nucleotides is compelling in lower invertebrates and overwhelming in mammals [2]. ATP, and its degradation product adenosine, are well recognized neurotransmitters in both the central and peripheral nervous system, but their signalling role in other systems is not yet fully acknowledged. In this respect, it is ironic that identification of ATP as the high energy intermediate in muscle and first description of extracellular ATP and adenosine effects on heart beat occurred in the same year, 1929 [3,4], but while the role of ATP as an intracellular high energy intermediate was plainly accepted, it took almost a century to acknowledge its participation in extracellular signalling. This is even more surprising from the immunologist standpoint. Students of inflammation and innate immunity have always been busy investigating the elementary signals released by distressed cells that alert the immune system of an impending danger. Nowadays, it is a solid observation that detection of a foreign microorganism is not by itself sufficient to start inflammation, but recognition of a damage is also needed. In fact, recognition of damage is even more important than detection of a foreign agent, as clearly shown by the occurrence of sterile inflammation.

2. ATP as a DAMP

Cells of innate immunity recognize PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) released by invading microorganisms, but they also need to detect DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) in order to be fully activated [5,6]. All DAMPs share the unique feature of being virtually absent in the extracellular environment in healthy conditions, while on the contrary are released quickly upon cell damage. Since their extracellular concentration is normally close to nil, even a small leakage of these compounds generates a large signal that can be quickly detected by nearby immune cells. Several intracellular molecules have been so far listed in the DAMP family: high mobility group box 1 (HMGB1) protein,

* Corresponding author.
E-mail address: fdv@unife.it (F. Di Virgilio).

1286-4579/$ - see front matter © 2012 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.006

heat-shock proteins, nucleosomes, DNA and ATP [7]. Several features make ATP an ideal DAMP, probably better than the other molecules so far proposed to this role. First of all its huge outward-directed transmembrane gradient (cytosol concentration in the millimolar range, extracellular concentration in the low nanomolar range) makes it very easy to rapidly generate a large extracellular signal following even minor cellular insults; secondly, ATP is highly diffusible through the aqueous extracellular environment thanks to its charges (2 or 4 negative charges depending on the pH and extracellular cation concentration); thirdly, ATP binds with varying affinity to a large family of specific cognate receptors, a feature that confers to ATP-based signalling a unique plasticity; fourthly, the ATP signal can be quickly terminated by ubiquitous ecto-ATPases, thus fulfilling a basic requirement of every bona fide messenger molecule, i.e. rapid inactivation when the message is no more needed [2,8].

In the initial phases of inflammation DAMP signalling is exquisitely needed to activate dendritic cells (DCs) and therefore to modulate the ensuing immune response, thus it is anticipated that an additional requirement of ATP in order to be considered a DAMP is that this nucleotide acts on the DCs to potentiate antigen presentation and direct the evolution of the immune response. Several reports now confirm the key immunoregulatory role of extracellular ATP proposed in early studies [9–12]. As any extracellular, membrane-impermeant, mediator ATP is sensed by plasma membrane receptors named P2 receptors. In turn, adenosine is sensed by the other members of the purinergic receptor family named P1 receptors. P2 receptors are further subdivided into P2Y (G protein coupled) and P2X (intrinsic ion channels). Four P1 receptor subtypes (A1, A2A, A2B and A3), eight P2Y (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) and seven P2X (P2X1-7) subtypes are known [13,14]. Basically all P1 and P2 receptor subtypes are expressed by immune cells, in a cell type- and differentiation-dependent fashion.

As it is often the case in the signalling field the fundamental question of the detection and measurement of the putative mediator (ATP) in the extracellular environment has remained unanswered for a long time due to lack of suitable tools to measure the ATP concentration in the interstitial fluid *in vivo*.

Measuring ATP in the extracellular environment avoiding at the same time any possible cell damage that might by itself trigger ATP release is a daunting task, something comparable to Eisenberg uncertainty principle, if “parva licet componere magnis”. It is in fact a common observation that even minor cell perturbations, such as for example rinsing cell monolayers with culture medium, trigger large ATP release, thus we can imagine what happens any time investigators stick an electrode into a tissue to measure adenosine or ATP release [15]. This intrinsic difficulty in ATP measurement has been tackled (and hopefully solved) by our group with the engineering of a modified luciferase targeted to and stably expressed on the cell plasma membrane (catalytic site outside) [16]. We anticipated that such a probe, named pmeLUC (plasma membrane luciferase) would allow measurement of ATP in the pericellular milieu. This prediction has been fulfilled in numerous experimental settings [17–19], thus making pmeLUC the probe of choice to measure extracellular ATP *in vivo*. The convergent indication stemming from the application of pmeLUC to extracellular ATP measurement has been that while concentration of this nucleotide in healthy tissues is negligible, and in any case below detection level, at sites of inflammation or within tumor microenvironment the concentration can be as high as hundreds micromolar [17,18]. This concentration is sufficient to activate even the low affinity P2X7 receptor and to generate large amounts of the anti-inflammatory agent adenosine. The obvious question then arises as to how this large extracellular ATP concentration is generated and exploited by inflammatory cells to orient themselves through the inflamed tissue, reach and destroy the causative agent, and finally repair the tissue.

3. Extracellular ATP: an immunomodulatory factor

For a long time it has been assumed that the only pathway for cellular ATP release was plasma membrane damage or overt cell injury. We now know that all cells are capable of non-lytic ATP release and that this autocrine/paracrine purinergic stimulation has a key role in the pathophysiology of immune cells. Several mechanisms are responsible for ATP release: exocytosis of ATP-containing granules, plasma membrane carriers, large conductance channels such as connexins and pannexins, and P2 receptors themselves such as P2X7 [20,21]. It is not clear which ATP release mechanism predominates in immune cells, but it is likely that multiple release pathways are involved, possibly also depending on the activating stimulus and the given pathophysiological condition. Some ATP release pathways are of particular interest because they might trigger an autoregenerative ATP release loop resulting in spreading and amplification of the ATP signal. This is the case of ATP release through P2X7, as released ATP might feed back onto the P2X7 receptor itself to keep it in an open state and thus allow further ATP release. Release of ATP at the inflammatory site generates an ATP concentration gradient that might be exploited by inflammatory cells for chemotaxis. There is evidence that chemotactic peptides trigger ATP release from the leading edge of neutrophils and that ATP activates P2Y2 receptors that in turn potentiate the chemotactic signal [21]. Chemotaxis implies sensing and moving through the chemotactic gradient. Activation of neutrophils movement through the chemotactic gradient seems to be due to adenosine accumulation at the leading edge of the chemotacting neutrophil and the following A3 receptor stimulation [22]. More recent studies suggest that ATP is not directly involved in inflammatory cell chemotaxis, but rather is a prerequisite for the production of chemotactic factors at the site of inflammation [12]. It is proposed that ATP activates stromal or resident inflammatory cells (very likely tissue macrophages) to generate an inflammatory microenvironment that produces the chemotactic gradient for the neutrophils. Other investigators also see ATP not as true chemotactic signal but rather as a signal of cell distress that in turn a) induces the release of chemotactic factors from nearby

cells and b) modulates activation of receptors for chemotactic factors [23]. However, evidence obtained by other investigators suggest that ATP (and ADP) might function as a true chemotactic signal [24,25] and that pannexins might be involved in the generation of the ATP gradient generated by apoptosing cells [26]. Among other nucleotides, UTP has been shown to have a strong chemotactic activity against neutrophils and mast cells [27]. More recently, hematopoietic stem cells were shown to chemotact in response to UTP [28,29]. Receptors involved are the G-protein coupled P2Yrs, mainly P2Y2, P2Y6, P2Y12 and P2Y13. Thus, inflammatory cells respond to a graded nucleotide concentration by moving towards the gradient core. Once inflammatory cells have reached the center of the inflammatory site, it is likely that the elevated ATP levels function as a "stop signal", probably acting at the P2X7 receptor.

Dendritic cells (DCs) offer an interesting example of immune cell responses to a nucleotide gradient. In fact, only immature DCs chemotact to nucleotides, while mature DCs, despite they express P2 receptors to the same level as immature DCs, are fully non-responsive [30]. This suggests that, once DCs have localized and captured the Ag and migrated to the lymph nodes, there is no need to remain sensitive to attraction generated by cell-released danger signals, in fact mature DCs should lose nucleotide-dependent chemotactic activity in order to migrate from the ATP-rich inflammatory site to the lymph nodes. Exposure to a graded ATP concentration moulds DC responses in multiple fashions. It is well known that after Ag capture DC start a complex differentiation process that leads to maturation and therefore to full ability to present Ag to lymphocyte and start an immune response. Depending on the type and amount of cytokine released and the co-stimulatory molecules expressed, DC will drive naïve CD^{4+} T lymphocyte differentiation towards a Th1, Th2, Th17 or Treg phenotype. Such a differentiation process is strongly affected by the inflammatory microenvironment and by the ATP concentration. It has been shown by several groups that incubation of DCs in the presence of micromolar ATP concentrations drives DC maturation towards a Th2 phenotype [31,32], and more recently that autocrine ATP release modulates the differentiation of Treg cells [33,34]. The ATP-rich microenvironment affects other key immune cell functions such as phagocytosis, phagosome-lysosome fusion and release of cytotoxic mediators. Long ago, high extracellular ATP levels were shown to inhibit phagocytosis in mouse macrophages [35]. The inhibitory effect of ATP on particle ingestion was confirmed in human monocytes and shown to be P2X7-dependent [36]. On the other hand, UDP acting at the P2Y6 receptor is a potent trigger of phagocytosis in microglia [37]. Extracellular ATP has further distinct effects downhill to phagocytosis as ATP-mediated P2X7 stimulation is a strong inducer of phagosome-lysosome fusion and subsequent killing of ingested microorganisms [38,39]. The microbicidal activity due to P2X7 stimulation had been originally assigned to its pro-apoptotic effect, however subsequent experiments suggest that facilitation of phagosome-lysosome fusion has itself a potent microbicidal activity by exposing the ingested microrganism to lysosomal content. This view is further supported by the ability of extracellular ATP to cause the release of reactive oxygen species (ROS) via the mitochondria or NADPH oxidase activation.

An essential aspect of the immunomodulatory activity of ATP and P2 receptors is the cytokine-releasing activity. This was first described for IL-1B [40], but has been later showed for several other crucial cytokines [41–44]. Secretion of other cytokines, e.g. IL-12, on the other hand is inhibited by extracellular ATP [31,42]. It must be stressed that ATP effects are very much dose- and receptor subtype- dependent, as while at low doses ATP has mainly an immunosuppressive, tolerogenic, activity (presumably acting at P2Y1 and/or P2Y11 receptors, at high doses the effect is mainly pro-inflammatory, very likely acting at P2X7 [45]. Therefore, low ATP doses preferentially activate immunosuppressive or tolerogenic pathways, while high doses trigger pro-inflammatory pathways [46]. ATP exerts a potent modulatory activity also on chemokine secretion, inducing release of CCl22 and decreasing LPS-induced secretion of CXCL10 and CCL5. The net effect of this modulation of cytokine and chemokine release in DCs is on one hand to reduce Th1 cell differentiation and recruitment and on the other to drive Th2 cell differentiation. Paradoxically, immunosuppressive pathways may also be activated via the classical pro-inflammatory P2X7 receptor, as reported by Robson and co-workers. These authors showed that mice deficient of CD39, the main ecto-ATP/ADPase, are protected against Con-A-induced hepatonecrosis because failure to degrade ATP causes an accumulation of this nucleotide to a level sufficient to trigger P2X7-mediated apoptosis of NKT cells, the main effector of Con-A induced liver injury [47]. ATP might also down-modulate the immune response by up-regulating thrombospondin and indoleamine 2,3-dioxigenase, factors known to inhibit T cell proliferation and stimulate TGF-β release. The shift in DC responses (from immunosuppresion to immunostimulation) in presence of increasing concentrations of extracellular ATP is consistent with the view that while graded exposure to DAMPs may preferentially cause adaptation to the new condition rather than an overt defensive response, a brisk and large increase in DAMPs is more likely to cause inflammation [45].

4. P2 receptors (P2X7) as drug targets

Identification of P2 receptors mediating the pro-inflammatory effects of extracellular nucleotides (mainly ATP) is a crucial issue in purinergic signalling as this might lead to the development of novel anti-inflammatory drugs. In vitro and *in vivo* data point to P2Y2 and P2X7 as the main P2 subtypes mediating the pro-inflammatory effects of ATP. P2Y2 is most probably responsible for recruitment of neutrophils, dendritic cells, eosinophils and macrophages at inflammatory sites, but it may also participate in release of pro-inflammatory factors such as for example elastase IL-33 or MCP-1/CCL2.

Among P2 receptors, P2X7 has received special attention since its participation to inflammation is more extensive and

more thoroughly characterized. In the hope to develop novel drugs for the treatment of inflammation more information have been gathered on the involvement of this receptor in the immune response than for the other P2 receptors. P2X7 belongs to the P2X receptor family of ATP-gated cation channels, but differs from the other P2X receptors in its C-terminus which is about 200 amino acid longer. Brief activation of P2X7 with extracellular ATP in its tetra-anionic form, ATP^{4-}, opens cation-specific ion channels. Prolonged ligation of P2X7 results in the formation of non-selective membrane pores, permeable to molecules of molecular mass up to 900 Da, as shown experimentally by the uptake of fluorescent dyes. Depending on the cell type, P2X7 stimulation triggers opening of non-selective pores which allows cationic and anionic dyes uptake. Formation of the non-selective pore is dependent on the cytoplasmic C-terminal domain of P2X7. Prolonged P2X7 activation can lead to membrane blebbing and cell death by lysis/necrosis or apoptosis, depending on the cell type. The cytotoxic effect dependent on P2X7 (originally named P2Z) activation was first described in mouse lymphocytes [9] and tentatively thought to be implicated in T-cell dependent cytotoxicity, but this hypothesis never received strong experimental support, thus it is fair to say that physiological significance of cell death mediated by the ligation of P2X7 by ATP remains unclear. However, in the light of the recent demonstration that ATP may reach several hundred micromolar levels in the interstitial fluid, the cytotoxic effect mediated by P2X7 should be reconsidered as it is not unlikely that part of the cell injurious effects of inflammation are indeed explained by the cytotoxic activity of ATP via the P2X7 receptor. In this respect, it also needs to be stressed that albeit two other P2 receptors have been implicated in cytotoxicity, P2X2 and P2X4, P2X7 expression is both necessary and sufficient to support ATP-mediated cytotoxicity in all cell models so far investigated.

More recent evidence suggest that tonic, low level, activation of P2X7 may in some conditions trigger growth or promote survival [48] via a combined effect on endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria Ca^{2+} content, mitochondrial potential and oxidative phosphorylation, and NFATc1 activation. Growth-promoting effects of P2X7 are relevant in T lymphocyte proliferation where a functional P2X7 receptor is needed to start mitogenic activation and to support growth [33]. It is not known if P2X7 is also implicated in proliferation in other immune cells. Further complexity in the participation of P2X7 in the regulation of immune cell functions is added by the recent discovery that a shorter P2X7 natural splice variant (named P2X7B) lacking the C-terminal region is highly expressed in lymphocytes [49]. This short isoform possesses most properties of the longer isoform except for the non-selective pore formation. In a cell model (HEK293 cells) transfected with both receptors, the longer P2X7 isoform (P2X7A) and P2X7 B can assemble on the cell plasma membrane forming a heterotrimeric receptor with distinct functional properties. Surprisingly, the shorter P2X7 isoform, rather than acting as a dominant negative, stabilizes plasma membrane expression of P2X7 and potentiates its responses. Thus, P2X7 may have different properties depending upon the ratio of shorter vs. longer isoforms in the heterotrimer. It is unknown whether native P2X7A/B heterotrimers exist and if so what their function might be, but it is intriguing that mitogenic stimulation of T lymphocytes causes an increase in P2X7A, but most notably in P2X7B transcription [49]. Stimulaton of T cell receptors on T lymphocytes triggers the release of intracellular ATP which stimulates cell surface P2X7 leading to Ca^{2+} influx, NFAT activation and IL-2 synthesis.

There is growing evidence that P2X7 participates in CD^{4+} T lymphocytes differentiation in multiple and as yet only partially understood ways. One one hand P2X7 appears to be constitutively expressed by Treg cells, but on the other P2X7 stimulation inhibits Treg responses and skews their differentiation towards a Th17 phenotype [34]. A role for P2X7 has also been shown in macrophage differentiation where this receptor modulates cell fusion in the typical process of multinucleated giant cell formation occurring in granuloma, or during osteoclast differentiation in the bone [50]. These studies highlighted an additional function of P2X7 in purinergic signalling: a pathway for ATP release. In fact, until recently search for the elusive pathways mediating non-lytic ATP release had mainly concentrated on vesicle-mediated release or plasma membrane channels belonging to the connexin/pannexin family [20,51]. Now, we know that P2X7 can be a pathway for ATP release thus generating its own ligand. Experiments in osteoclasts further point to the existence on the plasma membrane of a structured complex of molecules involved in ATP signalling (ATP signalosome?) comprising ATP-generating systems (P2X7 and other plasma membrane conduits), P2 receptors, ecto-ATPases and P1 receptors. It is increasingly clear that the multiple facets of purinergic signalling and its profound pathophysiological implications can only be understood in the context of the “ATP signalosome”.

5. P2X7-dependent activation of proteolytic pathways

It has been shown by several investigators that P2X7 stimulation leads to the activation of various caspases or metalloproteases. A paradigm of this activity is the proteolytic processing and release of IL-1β and IL-18 by microglia and macrophages [52]. Schematically, the release of these interleukins requires two signals. The first signal via Toll-like receptors drives pro-IL-1β and pro-IL-18 expression and accumulation in the cytosol. The second signal via P2X7 triggers the proteolytic cleavage of leaderless pro-IL-1β and pro-IL-18 and the release of the mature cytokines. In fact, P2X7 is a potent activator of the NLRP3 inflammasome, which is a large multimeric protein platform composed of NLRP3, the adaptator ASC and procaspase 1. Oligomerisation of procaspase 1 leads to its proteolytic activation and the production of active caspase 1 which is involved in the proteolytic processing of pro-interleukins into their active form. P2X7 activation also triggers the proteolytic cleavage of plasma membrane proteins such as L-Selectin, CD23, TNFα, CD27, matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 receptor

[53–57]. Recently Delarasse et al. have shown that P2X7 activation induces the proteolytic cleavage and shedding of the soluble fragment of the amyloid precursor protein (sAPPα) from neuroblastoma cells, in the absence of ADAM9, 10 and 17 [58]. The P2X7-dependent protease involved in the generation of sAPPα fragment was not identified but several pharmacological inhibitors suggested that a metalloprotease(s) is involved in this processing pathway [58]. Thus, P2X7 stimulation can stimulate other ADAMs than ADAM10 and 17.

6. P2X7 and autoimmune diseases

Macrophages from P2X7 ko mice are unable to release mature IL-1β and IL-18 after LPS stimulation followed by P2X7 activation [59]. Therefore, the potential role of P2X7 in systemic or organ-specific auto-immune diseases has been tested in mice deficient for the P2X7 gene. In a monoclonal anti-collagen induced arthritis, Labasi et al. have clearly shown that mice lacking P2X7 developed less severe arthritis than wt animals [60]. Less severe cartilage destructions and synovial inflammation as well as decrease in collagen cleavage products were found in P2X7-deficient mice suggesting that the lack of P2X7 leads to a decrease in pro-inflammatory cytokines such as IL-1β known to be involved in arthritis severity. In humans, Portales-Cervantes et al. have analysed the role of P2X7 in systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) [61]. They studied P2X7 expression and function and two genetic polymorphisms (1513 A/C and 762 T/C) in 101 SLE and 122 RA patients compared to healthy controls. They did not find differences in the frequency of the genetic polymorphisms in patients and controls. In contrast, Al-Shukaili et al. found that the presence of rheumatoid factor and anti-MCV autoantibody was significantly associated with the 1513 A/C polymorphism, in RA patients [62]. In RA patients, Portales-Cervantes et al. found a significant increase in IL-1β released from ATP-stimulated monocytes as compared to those of healthy controls. In contrast, ATP-triggered monocytes from SLE patients showed a significant decrease in IL-1β production as compared to controls. Thus, the observations made in RA patients are compatible with those made in the mouse model of arthritis even though the defects found in humans are moderate. Overall, P2X7 seems to be involved in arthritis severity while its role in SLE remains elusive. The potential involvement of P2X7 in SLE relies on genomic studies which identified 14 lupus susceptibility loci among which the human SLE locus SLEB4 at 12q24 which includes the gene encoding P2X7 [63,64].

Since the incidence and gravity of arthritis induced by anti-collagen antibodies is reduced in P2X7 ko mice, two different groups used this mouse strain to study the role of P2X7 in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an inflammatory demyelinating disease of the CNS induced in susceptible species and strains of mice by immunisation with CNS myelin, or myelin proteins. EAE shares many similarities with the various Multiple Sclerosis subtypes. Interestingly, Chen and Brosnan found that P2X7 deficient animals develop more severe EAE than wt animals [65]. Indeed, a significant increase in the number of lesions in the CNS was found in P2X7 ko as compared to wt animals. Importantly, using bone marrow chimeras, Chen and Brosnan showed that bone marrow derived cells from P2X7 ko mice increased the severity of the disease in irradiated wt mice. Furthermore, the number of apoptotic cells in brain and spinal cord was higher in wt CNS than in P2X7 ko animals. Overall, these data suggest that the decrease in apoptosis of lymphocytes in the CNS plays a major role in the worsening of EAE in P2X7 ko. In contrast to this study, Sharp et al. found, in a different P2X7 ko mouse strain, that the incidence of MOG-induced EAE is reduced when compared to wt animals [66]. The discrepancy between these studies might due to the usage of two different P2X7 ko lines: Pfizer vs GlaxoSmithKline (GSK) P2X7 ko animals. Indeed, it was recently suggested that the GSK-P2X7 ko mice express a functional P2X7 in T lymphocytes but not in macrophages and dendritic cells [67]. In addition, Nicke et al. have identified a P2X7 (k) isoform which is expressed in the GSK but not in the Pfizer P2X7 ko [68]. This P2X7 (k) variant was shown to have an 8-fold higher ligand sensitivity and to transduce signals more efficiently than the commonly expressed P2X7 (a) isoform. Thus, these results showing that the GSK P2X7 ko mice might express a functional isoform of P2X7 in T lymphocytes suggest that in these ko animals the decrease in the EAE incidence might be due to the presence of P2X7 (k) on T lymphocytes, which down modulates autoimmune responses.

It is well established that cell populations different from lymphocytes express P2X7 in the CNS. In particular, microglial cells also express P2X7 which, after activation, triggers the production, among several other inflammatory mediators, of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) an endocannabinoid that activates neuronal CB1 receptors [69]. Stimulation of these receptors reduces glutamate release and inhibits excitotoxicity decreasing tissue damages. In addition, activation of CB2 receptors expressed by microglial cells and lymphocytes decreases the production and release of pro-inflammatory cytokines and free radicals. Witting et al. have also determined that stimulation of P2X7 during EAE leads to increased endocannabinoid production and reduces cellular destructions. They found that the brain amounts of endocannabinoid were not augmented in wt mice suffering of EAE and showing axonal damages as compared to control animals [69]. These observations show that cellular destruction occurring during EAE does not lead to increased production of neuroprotective endocannabinoids as found in various neuropathologies. In addition, in animals undergoing EAE, the production of endocannabinoid (2-AG) was significantly decreased in the CNS of P2X7 ko animals as compared to wt mice witting [69]. This reduction in 2-AG levels found in P2X7 ko mice correlated well with increased tissue destructions found in these animals compared to wt mice. It is worth noticing that in addition to microglial cells, astrocytes express P2X7 and are able to produce 2-AG albeit in much lower amounts as compared to microglia. However, being the astrocyte population larger than microglia, one can hypothesize that

astrocyte production of 2-AG significantly contributes to neuroprotection. Thus, expression of P2X7 by microglial cells and astrocytes should protect from EAE even though endocannabinoid production is partially inhibited by EAE indepently of P2X7.

Oligodendrocytes which are the target of autoimmune attacks in EAE were shown to express functional P2X7 and triggering of this receptor lead to oligodendrocyte death *in vitro* and *in vivo* [70]. Interestingly, treatment of mice with pharmacological inhibitors of P2X7 inhibited chronic EAE by decreasing demyelination. The analyses of optic nerves from MS patients and healthy controls revealed that P2X7 mRNA and protein were significantly increased in patients compared to controls. Thus, P2X7 stimulation may increase tissue damage in the CNS of MS patients as it does in mice suffering from EAE. Altogether, these results suggest that P2X7 on oligodendrocytes aggravate EAE while its presence on aggressive T lymphocytes, microglial cells and astrocytes protects from this organ-specific autoimmune disease.

In four mouse models of inflammatory bowel disease Gulbransen et al. have demonstrated that enteric neurons which express P2X7 undergo neuronal death following colitis inflammation [71]. Inhibition of P2X7 with its pharmacological inhibitor o-ATP prevented myenteric neuronal death but did not block the pathological signs associated with colitis such as macroscopic damages and weight losses. In addition, neuronal death was shown to be caspase-dependent and blocked by the pan-caspase inhibitor Z-VAD. The authors suggested that enteric neuronal death was dependent on pannexin-1 (Panx1) because it was inhibited by the selective peptide inhibitor ^{10}Panx and the pharmacological inhibitor probenicid. The authors suggested that panx-1 activation might be needed to activate the inflammasome and determined which components of this complex were required for neuronal death. Using two ko mouse strains, they showed that enteric neural death involved the protein Asc but not NLRP3. Importantly, they found that blocking panx1, caspases or the Asc pathway inhibited neuronal death but did not improve weight loss and macroscopic damage. Overall, these results may be therapeutically relevant because panx1 inhibition could protect enteric neurons during colitis and secure innervation of colonic muscle. However, in this study the direct involvement of P2X7 and panx1 in enteric neuronal death was mainly shown with the use of pharmacological inhibitors, P2X7 and/or panx1 ko animals should have been used to strengthen their conclusions.

Kawamura et al. have studied the role of P2X7 in Concanavalin-A induced autoimmune hepatitis [72]. It is known that ConA induced hepatitis is mediated by NKT cells because their elimination is protective. It has previously been shown that cell surface proteins from mouse T lymphocytes treated with NAD are ADP-ribosylated by the cell surface enzyme ADP-ribosyl transferase 2 (ART2) [73]. ADP-ribosylation of P2X7 induces its activation leading to Ca^{2+} influx, non selective pore formation and cell death. Among liver mononuclear cells, NKT and T lymphocytes but not NK cells express ADP-ribosyltranferase activity and are ADP-ribosylated on P2X7 provided that NAD is added [72]. Mice treated by NAD 2 h before ConA injection are protected from hepatitis because liver NKT cells are functionally inactivated. Importantly, when NAD was injected into mice 3 h after ConA, hepatitis severity was increased and 40% of the treated mice died [72]. The involvement of P2X7 in this response is cleary established because administration of NAD into ConA-stimulated wt mice induces important liver destruction while in P2X7 ko mice liver damage was strongly reduced. These experiments clearly show that P2X7 mediates opposite effects in ConA-induced autoimmune hepatitis. Inhibitory signals are delivered to naive NKT cells protecting from liver injury while stimulatory ones are given to activated NKT lymphocytes exacerbating autoimmune hepatitis.

Recently, the role of P2X7 in the development of type 1 diabetes in Non obese diabetic (NOD) mice was evaluated by Yi-Guang Chen et al. [74]. They compared the incidence of type 1 diabetes in NOD mice of three genotypes : P2X7 wt, P2X7$^{+/-}$, P2X7 ko. They found no significant differences between the three genotypes in both sexes. However, the same authors previously established that type 1 diabetes is accelerated in NOD mice lacking CD38. CD38 is an ectoenzyme which hydrolyses NAD and thus down modulates ADP-ribosylation of P2X7 by ART2 on T lymphocytes. Hence, the lack of CD38 leads to a decrease in P2X7 dependent NAD-induced cell death. In NOD.CD38 ko mice, the acceleration of type I diabetes was attributed to NAD-induced cell death of CD^{4+} invariant NKT cells and Foxp3 regulatory T lymphocytes [74]. Importantly, when the P2X7 deficiency was introduced in NOD. CD38 ko mice, they found that the lack of P2X7 abolished accelerated development of diabetes. Interestingly, Yi-Guang Chen et al. demonstrated that the numbers of CD^{4+} invariant NKT cells and Foxp3 regulatory T lymphocytes were restored in NOD double ko mice to the levels found in NOD mice [74]. Altogether, these results demonstrate that ADP-ribosylation of P2X7 triggers NAD-induced cell death of subpopulations of lymphocytes involved in the down modulation of type 1 diabetes in NOD mice.

The evaluation of P2X7 role in autoimmune diseases is complicated by its presence on various sub-populations of lymphocytes, on antigen presenting cells and macrophages and on cells which are the target of the autoimmune attack. In addition, the biological function of P2X7 on these cells varies, its stimulation can lead to cell death, cell proliferation, secretion of pro-inflammatory cytokines, production and release of neuroprotective endocannabinoids. Thus, the production and use of P2X7 conditional ko animals is required to improve and clarify our knowledge on the role of P2X7 in autoimmune diseases.

7. Conclusion

Although major progress has been achieved over the past ten years in the field of purinergic signalling several exciting areas of research remain to be investigated. The biochemical characterization of P2X7 heterotrimers with distinct isoform

composition should bring important information on the function of P2X7 on different subpopulations of T lymphocytes. This should stimulate proteomic analyses to identify the protein partners of these receptors and bolster efforts to characterize the biochemical pathways stimulated by the mitogenic P2X7 vs those triggering cell death. Up to now, the P2X7 ko mouse lines available have been produced by methods in which the neomycin cassette has not been removed from the inactivated gene. Thus, the impact of this cassette on the P2X4 gene, closely linked to P2X7, has not been evaluated. In addition, the removal of P2X7 from all cells in which it is naturally expressed prevents detailed analyses of its function on defined sub-populations of cells. The production of conditional ko mice in which one can control where and/or when P2X7 is expressed would be of major interest to delineate its role in physiological or pathological conditions. The development of more selective pharmacological agonists and antagonists of P2X receptors is required to analyse biochemical purinergic pathways more precisely. In addition, some of these drugs might be useful as therapeutic agents to block or stimulate P2X receptors in various pathophysiological conditions.

Acknowledgments

FDV is supported by grants from the Italian Association for Cancer Research (n. IG 5354), Telethon of Italy (n. GGP06070), the Ministry of Education (FIRB n. RBAP11FXBC and PRIN n. 2009LMEEEH), the European Community (ERA-NET n.) and institutional funds from the University of Ferrara.

JMK is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-07-BLAN-0089-02) and by Association France Alzheimer.

References

[1] G. Burnstock, A. Verkhratsky, Evolutionary origins of the purinergic signalling system, Acta Physiol. 195 (2009) 415–447.
[2] G. Burnstock, Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling, Pharmacol. Rev. 58 (2006) 58–86.
[3] K. Lohmann, Uber die pyrophosphatfraktion im muskel, Naturwissenschaften 17 (1929) 624–625.
[4] A. Drury, A. Szent-Gyorgy, The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart, J. Physiol. 68 (1929) 213–237.
[5] C.A. Janeway Jr., How the immune system works to protect the host from infection: a personal view, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (2001) 7461–7468.
[6] W.A. Muller, Sorting the signals from the signals in the noisy environment of inflammation, Sci. Signal. 4 (2011) e23.
[7] M.J. Bours, P.C. Dagnelie, A.L. Giuliani, A. Wesselius, F. Di Virgilio, P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation, Front. Biosci. 3 (2011) 1443–1456.
[8] H. Zimmermann, Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 362 (2000) 299–309.
[9] F. Di Virgilio, V. Bronte, D. Collavo, P. Zanovello, Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5′-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP, J. Immunol. 143 (1989) 1955–1960.
[10] C. Mutini, S. Falzoni, D. Ferrari, P. Chiozzi, A. Morelli, O.R. Baricordi, G. Collo, P. Ricciardi-Castagnoli, F. Di Virgilio, Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation, J. Immunol. 163 (1999) 1958–1965.
[11] F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. RyffeB, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, L. Zitvogel, Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors, Nat. Med. 15 (2009) 1170–1178.
[12] B. McDonald, K. Pittman, G.B. Menezes, S.A. Hirota, I. Slaba, C.C. Waterhouse, P.L. Beck, D.A. Muruve, P. Kubes, Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation, Science 330 (2010) 362–366.
[13] R.A. North, A. Surprenant, Pharmacology of cloned P2X receptors, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000) 563–580.
[14] B.S. Khakh, R.A. North, P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease, Nature 442 (2006) 527–532.
[15] E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou, N. Dale, Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue, Anal. Chem. 77 (2005) 3267–3273.
[16] P. Pellegatti, S. Falzoni, P. Pinton, R. Rizzuto, F. Di Virgilio, A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion, Mol. Biol. Cell. 16 (2005) 3659–3665.
[17] P. Pellegatti, L. Raffaghello, G. Bianchi, F. Piccardi, V. Pistoia, F. Di Virgilio, Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase, PLoS ONE 3 (2008) e2599.
[18] F.C. Weber, P.R. Esser, T. Muller, J. Ganesan, P. Pellegatti, M.M. Simon, R. Zeiser, M. Idzko, T. Jakob, S.F. Martin, Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity, J. Exp. Med. 207 (2010) 2609–2619.
[19] M. Michaud, I. Martins, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, F. Ghiringhelli, F. Di Virgilio, L. Zitvogel, G. Kroemer, Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice, Science 334 (2011) 1573–1577.
[20] P. Bodin, G. Burnstock, Purinergic signalling: aTP release, Neurochem. Res. 26 (2001) 959–969.
[21] W.G. Junger, Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling, Nat. Rev. Immunol. 11 (2011) 201–212.
[22] Y. Chen, R. Corriden, Y. Inoue, L. Yip, N. Hashiguchi, A. Zinkernagel, V. Nizet, P.A. Insel, W.G. Junger, ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors, Science 314 (2006) 1792–1795.
[23] M. Kronlage, J. Song, L. Sorokin, K. Isfort, T. Schwerdtle, J. Leipziger, B. Robaye, P.B. Conley, H.C. Kim, S. Sargin, P. Schon, A. Schwab, P.J. Hanley, Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis, Sci. Signal. 3 (2010) ra55.
[24] S. Honda, Y. Sasaki, K. Ohsawa, Y. Imai, Y. Nakamura, K. Inoue, S. Kohsaka, Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors, J. Neurosci. 21 (2001) 1975–1982.
[25] S.E. Haynes, G. Hollopeter, G. Yang, D. Kurpius, M.E. Dailey, W.B. Gan, D. Julius, The P2Y(12) receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides, Nat. Neurosci. 9 (2006) 1512–1519.
[26] F.B. Chekeni, M.R. Elliott, J.K. Sandilos, S.F. Walk, J.M. Kinchen, E.R. Lazarowski, A.J. Armstrong, S. Penuela, D.W. Laird, G.S. Salvesen, B.E. Isakson, D.A. Bayliss, K.S. Ravichandran, Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis, Nature 467 (2010) 863–867.
[27] M. Idzko, S. Dichmann, E. Panther, D. Ferrari, Y. Herouy, C. Virchow Jr., W. Luttmann, F. Di Virgilio, J. Norgauer, Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils, J. Cell. Physiol. 188 (2001) 329–336.
[28] R.M. Lemoli, D. Ferrari, M. Fogli, L. Rossi, C. Pizzirani, S. Forchap, P. Chiozzi, D. Vaselli, F. Bertolini, T. Foutz, M. Aluigi, M. Baccarani,

F. Di Virgilio, Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo, Blood (2004).
[29] L. Rossi, R. Manfredini, F. Bertolini, D. Ferrari, M. Fogli, R. Zini, S. Salati, V. Salvestrini, S. Gulinelli, E. Adinolfi, S. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Baccarani, R.M. Lemoli, The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration, Blood 109 (2007) 533−542.
[30] M. Idzko, S. Dichmann, D. Ferrari, F. Di Virgilio, A. la Sala, G. Girolomoni, E. Panther, J. Norgauer, Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors, Blood 100 (2002) 925−932.
[31] A. la Sala, D. Ferrari, S. Corinti, A. Cavani, F. Di Virgilio, G. Girolomoni, Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses, J. Immunol. 166 (2001) 1611−1617.
[32] A. la Sala, S. Sebastiani, D. Ferrari, F. Di Virgilio, M. Idzko, J. Norgauer, G. Girolomoni, Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes, Blood 99 (2002) 1715−1722.
[33] U. Schenk, A.M. Westendorf, E. Radaelli, A. Casati, M. Ferro, M. Fumagalli, C. Verderio, J. Buer, E. Scanziani, F. Grassi, Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels, Sci. Signal. 1 (2008) ra6.
[34] U. Schenk, M. Frascoli, M. Proietti, R. Geffers, E. Traggiai, J. Buer, C. Ricordi, A.M. Westendorf, F. Grassi, ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors, Sci. Signal. 4 (2011) ra12.
[35] S.S. Sung, J.D. Young, A.M. Origlio, J.M. Heiple, H.R. Kaback, S.C. Silverstein, Extracellular ATP perturbs transmembrane ion fluxes, elevates cytosolic [Ca2+], and inhibits phagocytosis in mouse macrophages, J. Biol. Chem. 260 (1985) 13442−13449.
[36] B.J. Gu, B.M. Saunders, C. Jursik, J.S. Wiley, The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsonized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP, Blood 115 (2010) 1621−1631.
[37] S. Koizumi, Y. Shigemoto-Mogami, K. Nasu-Tada, Y. Shinozaki, K. Ohsawa, M. Tsuda, B.V. Joshi, K.A. Jacobson, S. Kohsaka, K. Inoue, UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis, Nature 446 (2007) 1091−1095.
[38] R. Coutinho-Silva, L. Stahl, M.N. Raymond, T. Jungas, P. Verbeke, G. Burnstock, T. Darville, D.M. Ojcius, Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation, Immunity 19 (2003) 403−412.
[39] R. Coutinho-Silva, G. Correa, A.A. Sater, D.M. Ojcius, The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle, Purinergic Signal. 5 (2009) 197−204.
[40] D. Perregaux, C.A. Gabel, Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity, J. Biol. Chem. 269 (1994) 15195−15203.
[41] D. Ferrari, A. la Sala, P. Chiozzi, A. Morelli, S. Falzoni, G. Girolomoni, M. Idzko, S. Dichmann, J. Norgauer, F. Di Virgilio, The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release, FASEB J. 14 (2000) 2466−2476.
[42] G. Hasko, D.G. Kuhel, A.L. Salzman, C. Szabo, ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages, Br. J. Pharmacol. 129 (2000) 909−914.
[43] W.H. Loomis, S. Namiki, R.S. Ostrom, P.A. Insel, W.G. Junger, Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation, J. Biol. Chem. 278 (2003) 4590−4596.
[44] M. Idzko, E. Panther, H.C. Bremer, S. Sorichter, W. Luttmann, C. Virchow Jr., F. Di Virgilio, Y. Herouy, J. Norgauer, D. Ferrari, Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils, Br. J. Pharmacol. 138 (2003) 1244−1250.
[45] F. Di Virgilio, J.M. Boeynaems, S.C. Robson, Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity, Curr. Opin. Pharmacol. 9 (2009) 507−513.
[46] J.M. Boeynaems, D. Communi, Modulation of inflammation by extracellular nucleotides, J. Invest. Dermatol. 126 (2006) 943−944.
[47] G. Beldi, Y. Wu, Y. Banz, M. Nowak, L. Miller, K. Enjyoji, A. Haschemi, G.G. Yegutkin, D. Candinas, M. Exley, S.C. Robson, Natural killer T cell dysfunction in CD39-null mice protects against concanavalin A-induced hepatitis, Hepatology 48 (2008) 841−852.
[48] E. Adinolfi, M.G. Callegari, D. Ferrari, C. Bolognesi, M. Minelli, M.R. Wieckowski, P. Pinton, R. Rizzuto, F. Di Virgilio, Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth, Mol. Biol. Cell. 16 (2005) 3260−3272.
[49] E. Adinolfi, M. Cirillo, R. Woltersdorf, S. Falzoni, P. Chiozzi, P. Pellegatti, M.G. Callegari, D. Sandona, F. Markwardt, G. Schmalzing, F. Di Virgilio, Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor, FASEB J. 24 (2010) 3393−3404.
[50] P. Pellegatti, S. Falzoni, G. Donvito, I. Lemaire, F. Di Virgilio, P2X7 receptor drives osteoclast fusion by increasing the extracellular adenosine concentration, FASEB J. 25 (2010) 1264−1274.
[51] R.Z. Sabirov, Y. Okada, ATP release via anion channels, Purinergic Signal. 1 (2005) 311−328.
[52] D. Ferrari, P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O.R. Baricordi, F. Di Virgilio, Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages, J. Immunol. 159 (1997) 1451−1458.
[53] B. Gu, L.I. Bendall, J.S. Wiley, Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases, Blood 92 (1998) 946−951.
[54] T. Suzuki, I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue, Y. Nakata, Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia, J. Neurosci. 24 (2004) 1−7.
[55] B.J. Gu, J.S. Wiley, Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor, Blood 107 (2006) 4946−4953.
[56] H. Moon, H.Y. Na, K.H. Chong, T.J. Kim, P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes, Immunol. Lett. 102 (2006) 98−105.
[57] C. Garbers, N. Janner, A. Chalaris, M.L. Moss, D.M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John, J. Scheller, Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding, J. Biol. Chem. 286 (2011) 14804−14811.
[58] C. Delarasse, R. Auger, P. Gonnord, B. Fontaine, J.M. Kanellopoulos, The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein, J. Biol. Chem. 286 (2011) 2596−2606.
[59] M. Solle, J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths, C.A. Gabel, Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors, J. Biol. Chem. 276 (2001) 125−132.
[60] J.M. Labasi, N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M.M. Payette, W. Brissette, J.R. Wicks, L. Audoly, C.A. Gabel, Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response, J. Immunol. 168 (2002) 6436−6445.
[61] L. Portales-Cervantes, P. Nino-Moreno, L. Doniz-Padilla, L. Baranda-Candido, M. Garcia-Hernandez, M. Salgado-Bustamante, R. Gonzalez-Amaro, D. Portales-Perez, Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, Hum. Immunol. 71 (2010) 818−825.
[62] A. Al-Shukaili, J. Al-Kaabi, B. Hassan, T. Al-Araimi, M. Al-Tobi, M. Al-Kindi, A. Al-Maniri, A. Al-Gheilani, A. Al-Ansari, P2X7 receptor gene polymorphism analysis in rheumatoid arthritis, Int. J. Immunogenet. 38 (2011) 389−396.
[63] S.K. Nath, A.I. Quintero-Del-Rio, J. Kilpatrick, L. Feo, M. Ballesteros, J.B. Harley, Linkage at 12q24 with systemic lupus erythematosus (SLE)

is established and confirmed in Hispanic and European American families, Am. J. Hum. Genet. 74 (2004) 73–82.
[64] J.I. Elliott, J.H. McVey, C.F. Higgins, The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products, Arthritis Res. Ther. 7 (2005) R468–R475.
[65] L. Chen, C.F. Brosnan, Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R−/− mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes, J. Immunol. 176 (2006) 3115–3126.
[66] A.J. Sharp, P.E. Polak, V. Simonini, S.X. Lin, J.C. Richardson, E.R. Bongarzone, D.L. Feinstein, P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Neuroinflammation 5 (2008) 33.
[67] S.R. Taylor, M. Gonzalez-Begne, D.K. Sojka, J.C. Richardson, S.A. Sheardown, S.M. Harrison, C.D. Pusey, F.W. Tam, J.I. Elliott, Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses, J. Leukoc. Biol. 85 (2009) 978–986.
[68] A. Nicke, Y.H. Kuan, M. Masin, J. Rettinger, B. Marquez-Klaka, O. Bender, D.C. Gorecki, R.D. Murrell-Lagnado, F. Soto, A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice, J. Biol. Chem. 284 (2009) 25813–25822.
[69] A. Witting, L. Chen, E. Cudaback, A. Straiker, L. Walter, N. Rickman, T. Moller, C. Brosnan, N. Stella, Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 6362–6367.
[70] C. Matute, I. Torre, F. Perez-Cerda, A. Perez-Samartin, E. Alberdi, E. Etxebarria, A.M. Arranz, R. Ravid, A. Rodriguez-Antiguedad, M. Sanchez-Gomez, M. Domercq, P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Neurosci. 27 (2007) 9525–9533.
[71] B.D. Gulbransen, M. Bashashati, S.A. Hirota, X. Gui, J.A. Roberts, J.A. Macdonald, D.A. Muruve, D.M. McKay, P.L. Beck, G.M. Mawe, R.J. Thompson, K.A. Sharkey, Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis, Nat. Med. 18 (2012) 600–604.
[72] H. Kawamura, F. Aswad, M. Minagawa, S. Govindarajan, G. Dennert, P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis, J. Immunol. 176 (2006) 2152–2160.
[73] M. Seman, S. Adriouch, F. Scheuplein, C. Krebs, D. Freese, G. Glowacki, P. Deterre, F. Haag, F. Koch-Nolte, NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor, Immunity 19 (2003) 571–582.
[74] Y.G. Chen, F. Scheuplein, J.P. Driver, A.A. Hewes, P.C. Reifsnyder, E.H. Leiter, D.V. Serreze, Testing the role of P2X7 receptors in the development of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice, J. Immunol. 186 (2011) 4278–4284.