

**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : **Pr Denis ANGOULVANT**
Unité : **EA4245 « Cellules Dendritiques Immuno-modulation et Greffes »**
Equipe (*si unité multi-équipes*):
Filière de rattachement : **Filière B**
Email de l'encadrant : denis.angoulvant@univ-tours.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : **Dr Fabrice IVANES**
(Soutenance HDR programmée en 2018)

2. Titre de la thèse : Etude du rôle du récepteur purinergique P2X4 dans les cellules dendritiques et la réponse inflammatoire associée au processus d'ischémie-reperfusion myocardique.

3. Résumé :

Les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique sont une source majeure de dommages myocardiques irréversibles. Elles sont rencontrées dans un grand nombre de situations cliniques telles que l'infarctus du myocarde reperfusé, la transplantation cardiaque, la chirurgie cardiaque et l'arrêt cardiaque réanimé. Cependant, actuellement, aucune stratégie thérapeutique ne permet de réduire ces lésions de reperfusion. Il est aujourd'hui clair que les réponses immuno-inflammatoires jouent un rôle critique dans l'établissement de ces lésions. Les alarmines libérées par les cellules cardiaques stressées se lient à des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules immunitaires, activant ainsi une réponse inflammatoire stérile, dirigée contre l'organe. Le blocage non spécifique de la réponse inflammatoire n'est cependant pas favorable car il s'oppose aux processus de cicatrisation nécessaires à la réparation partielle et/ou à la stabilisation des lésions.

Parmi les récepteurs de l'immunité, notre équipe s'intéresse aux récepteurs purinergiques (P2R) et à leur modulation en situation d'ischémie-reperfusion dans le but d'induire une tolérance immunitaire. Nous avons montré l'importance du récepteur P2Y11, dont le rôle immunosuppresseur permet de réduire l'inflammation médiée par les cellules dendritiques en situation d'ischémie-reperfusion (Chadet et al. 2015). De plus, l'activation du récepteur P2Y11 dans le cardiomyocyte *in vitro* (Benoist et al 2017 under review) ainsi que dans un modèle murin de transplantation cardiaque allogénique hétérotopique (Bourguignon et al, article en préparation) démontre des propriétés cardioprotectrices.

Le profil cytokinique du tissu traduit l'orientation de la réponse immuno-inflammatoire. La sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques, fait intervenir différents mécanismes dont le trafic antérograde des lysosomes. Le récepteur purinergique P2X4 est exprimé à la membrane plasmique ainsi qu'à la membrane lysosomale dans différents types cellulaires. Ce récepteur a été montré comme nécessaire à la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18 suite à l'activation du récepteur P2X7 dans les cellules dendritiques de souris.

Hypothèse : Le récepteur de l'immunité P2X4 est un acteur moléculaire important dans l'orientation de la réponse inflammatoire en situation d'ischémie-reperfusion myocardique, via son rôle dans la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires.

Objectifs : Ce nouveau projet vise à étudier le rôle de P2X4 dans la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques et dans l'orientation de la réponse immunitaire secondaire, en condition d'ischémie-reperfusion. L'objectif principal de ce projet est d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles immuno-modulatrices, permettant à la fois le développement d'un processus de cicatrisation efficace tout en limitant l'établissement d'une réponse inflammatoire excessive.

Méthodes : Nous travaillerons sur notre modèle de cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes CD14⁺, obtenus à partir du sang de donneurs de l'Etablissement Français du Sang. Grâce à une approche pharmacologique (TNP-ATP, 5-BDBD), nous étudierons le rôle du récepteur P2X4 dans la maturation des cellules dendritiques, leur sécrétion d'un panel de cytokines et l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs. Ces expériences seront réalisées en normoxie et comparées à celles effectuées en situation d'hypoxie-réoxygénation *in vitro* (enceinte à hypoxie). Ces résultats seront confirmés par l'utilisation d'ARN interférents. L'inhibition des voies de signalisation activées par le récepteur P2Y11 permettra d'analyser une potentielle communication entre ces récepteurs. Un modèle de co-culture (méthode des inserts) cellules dendritiques/cardiomyocytes humains (lignée AC16) sera utilisé afin de moduler l'activité du récepteur P2X4 tout en tenant compte de l'effet paracrine des alarmines libérées par les cardiomyocytes soumis à séquence d'hypoxie-réoxygénation. Les cytokines sécrétées dans ce modèle seront analysées en ELISA. Finalement, nous utiliserons un modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde reperfusé (ligature de l'artère interventriculaire antérieure) chez la souris et nous utiliserons différents agonistes et antagonistes afin d'analyser les conséquences de la modulation de P2X4 en cardioprotection. Nous étudierons la fonction cardiaque (échocardiographie) et l'infiltrat immunitaire (immunohistochimie), ferons une analyse des cytokines plasmatiques (multiplex) ainsi que des voies de signalisation activées dans le myocarde (western blot).

Résultats attendus et perspectives : Grâce à ce projet, nous pourrions identifier le rôle du récepteur purinergique P2X4 dans les réponses immuno-inflammatoires inhérentes au processus d'ischémie-reperfusion. Ces résultats nous apporteront une plus grande compréhension de la signalisation purinergique et des mécanismes de sa modulation. Ainsi, nous espérons identifier un nouvel acteur moléculaire qui pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle en cardioprotection.

4. Résumé en anglais :

Myocardial ischemia-reperfusion injury is a major cause of irreversible cardiac tissue damage. This process is involved in reperfused myocardial infarction, heart transplantation, cardiac surgery and cardiac arrest resuscitation. However, there is still no therapeutic strategy to prevent myocardial reperfusion injury. It is now clear that immuno-inflammatory responses strongly contribute to tissue damage. Indeed, during ischemia-reperfusion, stressed cardiac cells release danger signals, which bind to specific receptors on immune cells triggering a sterile inflammatory response.

Among innate immune receptors, our team is interested in purinergic receptors (P2R) and their modulation during ischemia-reperfusion to induce an immune tolerance. We previously showed that the P2Y11 receptor (P2Y11R) exhibits an immunosuppressive role in dendritic cells and that its activation leads to a reduction of inflammation during ischemia-reperfusion (Chadet et al. 2015). Modulation of P2Y11R in the cardiomyocyte *in vitro* (Benoist et al. 2017 under review) and in an *in vivo* model of murine heterogenic allogeneic heart transplantation (Bourguignon et al. in preparation) demonstrated cardioprotective properties.

The tissue-associated cytokine profile is related to the orientation of the immune response. Cytokine release by immune cells such as dendritic cells involves several mechanisms including lysosome anterograde trafficking. The P2X4 purinergic receptor is found at both plasma and lysosomal membranes in several cell types, and it regulates the P2X7-driven release of IL-1 β and IL-18 by mouse dendritic cells.

Hypothesis: The P2X4 receptor is a key molecular actor of the inflammatory response orientation during myocardial ischemia-reperfusion, through its role in cytokine secretion by immune cells.

Objectives: This new project aims to unravel the role of P2X4 in cytokine secretion by dendritic cells and in the subsequent immune response orientation during ischemia-reperfusion. The main objective of this project is to identify immuno-modulatory therapeutic targets, allowing an effective healing and preventing excessive inflammatory response.

Methods: We will use our model of dendritic cells differentiated from CD14⁺ monocytes, obtained from blood donors of the Etablissement Français du Sang. With a pharmacological approach (TNP-ATP, 5-BDBD), we will study P2X4 involvement in dendritic cell maturation, cytokine secretion and naïve CD4 T cell activation. These experiments will be performed under normoxia and hypoxia-reoxygenation conditions (hypoxia workstation). These results will be confirmed by the use of RNAi. The inhibition of P2Y11-dependent signalling pathways will enable us to identify a potential cross-talk between these two receptors. A co-culture model (transwell method) dendritic cells/cardiomyocytes (AC16 cell line) will be used to modulate P2X4 activity in taking into account the paracrine effects of danger signals released by cardiomyocytes during hypoxia-reoxygenation. The secreted cytokines will be evaluated by ELISA assays. Finally, *in vivo*, with a mouse model of reperfused myocardial infarction, we will test different agonists and antagonists to study the consequences of P2X4 modulation in cardioprotection. We will assess cardiac functions (echocardiography) and leukocyte recruitment (immunohistochemistry) and we will investigate plasma cytokines (multiplex) and the activated signalling pathways in the myocardium (western blot).