



HAL
open science

Immunorégulation par le NAD extracellulaire : activation via les ADP-ribosyl transférases du récepteur cytolytique P2X7

Sahil Adriouch

► **To cite this version:**

Sahil Adriouch. Immunorégulation par le NAD extracellulaire : activation via les ADP-ribosyl transférases du récepteur cytolytique P2X7. Biologie cellulaire. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2003. Français. NNT: . tel-00003698

HAL Id: tel-00003698

<https://theses.hal.science/tel-00003698>

Submitted on 4 Nov 2003

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.

**UNIVERSITE PARIS 7- DENIS DIDEROT
UFR DE BIOCHIMIE**

THESE

pour l'obtention du Diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7
SPECIALITE : IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement
par

Sahil ADRIOUCH

sujet de la thèse

**Immunorégulation par le NAD extracellulaire :
activation via les ADP-ribosyl transférase du récepteur cytolitique P2X7**

Soutenue le 24 juin 2003 devant le jury composé de :

Pr Jean KANELLOPOULOS	Président du jury
Dr Philippe DETERRE	Rapporteur
Dr François RASSENDREN	Rapporteur
Pr Catherine SAUTES-FRIDMAN	Examineur
Pr David OJCIUS	Examineur
Pr Michel SEMAN	Directeur de thèse

Remerciements

"L'Homme est un Homme avec l'autre" selon Nietzsche. Cette citation prend tout son sens quand il s'agit de présenter en son nom le travail d'une équipe et l'aboutissement d'un effort intellectuel et technologique partagé. Je tiens à remercier ici tous ceux qui ont contribué, de très près comme d'un peu plus loin, à ce que le fruit mûrisse à la lumière des points de vue propres à chacun.

Un remerciement chaleureux à M. le Professeur Michel Seman pour avoir su guider mes premiers coups de pinceaux sur la toile de la recherche tout en m'accordant la liberté d'œuvre chère à tout apprenti. Si c'est en "frottant sa cervelle à celle des autres" que l'on découvre le monde, je dois reconnaître que j'aurais beaucoup appris tant sur le plan scientifique que dans des domaines aussi variés que les arts, la politique ou l'Histoire en confrontant mes points de vue à la vaste culture de celui qui a été pour cela bien plus qu'un directeur de thèse.

Je tiens à remercier M. le Professeur Jean Kanellopoulos de me faire l'honneur de présider le jury de thèse ainsi que M. le Docteur François Rassendren et M. le Docteur Philippe Deterre d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je tiens à témoigner ma gratitude à ce dernier pour m'avoir aussi permis de présenter ce travail au membre du Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, pour avoir pris le temps de discuter des résultats et pour son aide à la mise au point de la mesure des réponses calciques. Je remercie également Mme le Professeur Catherine Fridman et M. le Professeur David Ojcius d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci évidemment à "nos amis allemands" tels que nous aimons à les qualifier, de l'institut d'immunologie de Hambourg et plus particulièrement M. le Professeur Friedrich Koch-Nolte et M. le Docteur Friedrich Haag avec qui nous avons construit une solide collaboration qui s'est transformée en une réelle amitié reliant la rive droite de l'Elbe à la rive gauche de la Seine.

Je remercie l'ensemble des personnes qui travaillent ou qui ont travaillé dans le laboratoire d'immunodifférenciation pour leurs assistances techniques, leurs conseils et leur bonne humeur. La liste serait trop longue aussi je prends soin de ne pas les nommer ce qui est aussi un moyen, certes commode, de n'oublier personne.

Enfin, un remerciement plus personnel à Delphine pour l'équilibre qu'elle m'apporte et pour son écoute toujours attentive de mes histoires d'enzymes et de récepteurs.

« Pour qu'un système s'auto-organise, il va de soi qu'il ne saurait y avoir seulement
création de diversité. »

Jean Pierre Changeux, *L'Homme neuronal*

RESUME

De nombreux récepteurs aux purines ont été caractérisés à la surface des cellules de mammifères. Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de multiples fonctions biologiques mais leur participation dans la mise en place de la réponse immune reste encore à clarifier. Sur les cellules de l'immunité, il existe en plus des récepteurs purinergiques P1 sensibles à l'adénosine et P2 sensibles à l'ATP, des enzymes membranaires ayant pour substrat le NAD. Ces enzymes sont des NAD-glycohydrolases et ADP-ribose cyclases comme CD38 et CD157 et des mono ADP-ribosyl transférases (ART), apparentées à certaines toxines bactériennes, qui catalysent le transfert covalent de l'ADP-ribose, contenu dans la molécule de NAD, vers des protéines cibles. La découverte récente de la famille des ART et leur expression sur les cellules immunes nous a conduit à évaluer le rôle immunorégulateur du NAD et ses effets sur les lymphocytes T au travers des ADP-ribosyl transférases.

Nous avons montré *in vitro* que le NAD, à des concentrations de l'ordre de 1 μ M, induit l'apoptose des lymphocytes T. Les premiers signes de cette apoptose sont détectables dès 5 minutes après un contact avec le NAD. Nous avons établi que ce processus rapide implique une ADP-ribosyl transférase, l'ART2.2, présente sur la membrane des lymphocytes T. Une approche génétique nous a permis de montrer que l'ART2.2 bien que nécessaire ne suffit pas, seule, à déclencher l'apoptose. Un second partenaire participe à ce processus. En utilisant des analogues du NAD, modifiés sur la base adénine, nous avons montré que ces analogues, bien que substrats de l'ART2.2, ne déclenchent pas l'apoptose et inhibent l'effet du NAD. Cette observation nous a conduits à émettre l'hypothèse que les récepteurs aux purines interviennent dans la signalisation par le NAD. Le récepteur P2X₇ est connu pour induire l'apoptose des cellules d'origine hématopoïétique lorsqu'elles sont incubées en présence d'ATP à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Nous avons pu montrer par des approches pharmacologiques et génétiques que ce récepteur à l'ATP est impliqué dans l'apoptose des lymphocytes T induite par le NAD bien qu'il soit lui-même insensible au NAD. Le NAD provoque l'activation de P2X₇ et l'ouverture subséquente d'un pore membranaire caractéristique perméable au YO-PRO-1 et au BET mais ce phénomène est dépendant de la présence de l'ART2.2 et résulte donc de l'ADP-ribosylation des protéines membranaires. Il s'agit d'un mécanisme original d'activation du récepteur P2X₇, intervenant à des concentrations de NAD 100 fois plus faibles que celles nécessaires pour induire la stimulation de P2X₇ par l'ATP.

L'étude de la sensibilité des lymphocytes T pris à différents stades de maturation montre que les effets du NAD concernent les lymphocytes T périphériques quiescents mais pas les thymocytes ni les lymphocytes activés. Globalement, ces données soulèvent la question du rôle physiologique de cette nouvelle voie de régulation de la biologie des lymphocytes T naïfs. Le NAD est normalement présent dans le sérum à des concentrations faibles de l'ordre de 0,1 μ M mais peut localement être libéré en quantité plus importante au voisinage de cellules lésées. Nous proposons que le NAD extracellulaire, présent au site inflammatoire à des concentrations supérieures au micromolaire, joue un rôle dans le maintien de la tolérance en prévenant l'activation « bystander » des cellules naïves dans un contexte où de nombreux auto-antigènes peuvent être présentés.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADA : adénosine désaminase	NFO23 : 8-(benzamido) naphthalène-1,3,5-acide trisulfonique
ADO : adénosine	NGD : nicotinamide guanine dinucléotide
ADP : adénosine 5'-diphosphate	NHD : nicotinamide hypoxanthine dinucléotide
ADPR : adénosine 5'-diphosphate ribose	Nico : nicotinamide
ADPRc : adénosine 5'-diphosphate ribose cyclique	NK : cellules cytotoxiques "natural killer"
AMP : adénosine 5'-monophosphate	NOS : oxyde nitrique synthétase
AMPc : adénosine 5'-monophosphate cyclique	NOS : oxyde nitrique synthétase
Ap_nA : diadénosine poly(n)-phosphate	NPP : nucléotide pyrophosphatase
ART : ADP-ribosyl transférase	NTP : nucléotide triphosphate
ATP : adénosine 5'-triphosphate	NTPDase : nucléoside triphosphate diphosphohydrolase
ATRA : acide rétinolique <i>all trans</i>	oATP : Adénosine 5'-triphosphate-2',3'-dialdéhyde
BET : bromure d'ethidium	PARP : poly(ADP-ribose) polymérase
BzATP : 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adénosine 5'-triphosphate	PHA : phyto-héma-aglutinine A
CE : concentration effective	PI : iodure de propidium
ConA : concanavaline A	PI : iodure de propidium
CTL : lymphocyte T cytotoxique	PI₄K : phosphoinositide 4-kinase
DAG : diacyl glycérol	PI-PLC : phosphatidyl inositol spécifique des phospholipase C
DID : diabète insulino-dépendant	PKC : protéine kinase C
DTT : dithiothreitol	PLA₂ : phospholipase A ₂
E-ADA : ecto adénosine désaminase	PLC : phospholipase C
E-NPP : ecto- nucléotide pyrophosphatase	PLD : phospholipase D
E-NTPDase : ecto- nucléoside triphosphate diphosphohydrolase	PMA : phorbol méristate acétate
etheno-NAD : nicotinamide 1,N ⁶ - ethenoadénine dinucléotide	PPADS : pyridoxal phosphate-6-azophényl-2',4'-acid disulfonique
GPI : phosphatidyl inositol glycosilé	PS : phosphatidyl-sérine
IC₅₀ : concentration inhibant 50% de l'activité	RCPG : récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G
IONO : ionomycine	ROS : molécules réactives dérivées de l'oxygène
IP₃ : inositol 1, 4, 5, phosphate	TNP-ATP : 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophényl)- adénosine 5'-triphosphate
KN-62 : 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine (S)-5-Isoquinolinesulfonic acid 4-[2-[(5-isoquinoliny)sulfonyl)méthylamino]-3-oxo-3-(4-phényl-1-piperaziny)propyl]phényl ester	UDP : uridine 5'-diphosphate
LPS : lipopolysaccharide	UTP : uridine 5'-triphosphate
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide	YO-PRO-1 : quinolinium, 4-(3-méthyl-2(3H)-benzoxazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonio) propyl]-, diiodide
NAM : nicotinamide mono-nucléotide	
NDP : nucléotide diphosphate	

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	6
INTRODUCTION	8
1. Les récepteurs P1 et P2	10
1.1 Classification	10
1.2 Les récepteurs P1	11
1.2.1 Le récepteur A ₁	13
1.2.2 Le récepteur A _{2A}	15
1.2.3 Les récepteurs A _{2B}	16
1.2.4 Les récepteurs A ₃	17
1.3 Les récepteurs P2	19
1.3.1 Les récepteurs P2Y	19
1.3.2 Les récepteurs P2X	22
1.3.2.1 Présentation générale des récepteurs P2X	22
1.3.2.2 Le récepteur P2X ₇	26
2. Les ecto-enzymes spécifiques des purines	29
2.1 Les ecto-enzymes catabolisant les purines libres extracellulaires	32
2.1.1 Les ecto-nucléosides triphosphates diphosphohydrolases : E-NTPDase	32
2.1.2 L'ecto-5'-nucléotidase : CD73	33
2.1.3 Les ecto-nucléotides pyrophosphatases / phosphodiesterases : E-NPP	34
2.1.4 L'ecto-adénosine déaminase : ecto-ADA	35
2.1.5 Les ecto-NADases / ADP-ribosyl cyclases : CD38 et CD157	36
2.2 Les ectoenzymes catalysant des modifications post-traductionnelles des protéines membranaires à partir des purines extracellulaires	39
2.2.1 Les ecto-protéines kinases	39
2.2.2 Les mono-ADP-ribosyl transférases (ART)	40
3. Origine des purines naturelles	47
3.1 Libération des purines contenues dans des granules sécrétoires	47
3.2 Libération de purines au travers de transporteurs membranaires	48
3.3 Libération de purines par les cellules lésées	49
4. Intervention des purines extracellulaires dans la régulation des fonctions immunes	50
4.1 Adénosine et immunité	53
4.2 ATP et fonctions immunes	54
4.3 Le NAD dans l'immunité innée et acquise	59
4.3.1 les fonctions de CD38 dans la régulation de l'immunité	59
4.3.2 Fonctions physiologiques des mono-ADP-ribosyl transférases (ART)	64
OBJECTIF DES TRAVAUX	68
RESULTATS	69
1. Le NAD inhibe la prolifération des lymphocytes T	70
2. Le NAD induit l'apoptose des lymphocytes T	70
3. Spécificité de l'effet apoptotique du NAD	71
4. Rôle des ART dans l'apoptose induite par le NAD	72

5. Implication d'un second facteur dans l'apoptose des cellules T induite par le NAD	74
6. Identification de P2X₇ comme le second facteur impliqué dans les effets du NAD	75
7. Une mutation ponctuelle du récepteur P2X₇ chez C57BL/6 est responsable de sa résistance à l'effet délétère du NAD sur les lymphocytes T	79
8. Comparaison entre les effets de l'ATP et ceux du NAD sur les lymphocytes T	81
9. La sensibilité des lymphocytes T au NAD dépend de leur stade de différenciation	82
10. Les sources du NAD extracellulaire	84
<i>Article 1</i>	86
<i>Article 2</i>	94
<i>Article 3</i>	100
<i>Article 4</i>	133
<i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i>	152
1. Le groupement ADP-ribose transféré sur les protéines membranaires peut-il se comporter comme un agoniste du récepteur P2X₇ ?	155
2. Existe-t-il un second site de fixation des ligands sur le récepteur P2X₇ ?	157
3. Les implications de la mutation P451L sur le fonctionnement du récepteur P2X₇	160
4. Comparaison des voies d'activation de P2X₇ par le NAD et l'ATP	162
5. Les sources et les concentrations de NAD <i>in vivo</i>	165
6. Relation entre les ART2 et les maladies autoimmunes	166
7. Le rôle des ART sur d'autres cellules du système immunitaire	168
8. L'ADP-ribosylation des protéines membranaires peut-elle stimuler d'autres récepteurs de la famille P2X ?	169
9. Les fonctions des ADP-ribosyl transférases chez l'Homme	170
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	172

INTRODUCTION

Dans tous les systèmes vivants, le métabolisme énergétique est dépendant d'une molécule, l'adénosine triphosphate (ATP) ce qui confère aux purines naturelles un rôle biologique capital. Cependant, dès 1929, Drury et Szent-Györgyi montrèrent que l'adénosine et l'AMP, isolés du cœur, ont des effets importants sur la contraction du muscle cardiaque et la pression sanguine (Drury, A. *et al.*, 1929). Ces observations établirent pour la première fois que les purines naturelles participent non seulement au stockage de l'énergie mais représentent une classe de molécules intervenant dans la communication cellulaire et la régulation des grandes fonctions physiologiques. En 1934, Gillespie apporta les premiers indices de l'existence d'une relation entre la structure et les fonctions des purines, en montrant d'abord que la déamination affecte profondément leur activité pharmacologique puis en démontrant que les différents dérivés phosphatés de l'adénosine présentent des pharmacologies distinctes (Gillespie, J.H., 1934). En effet, l'adénosine a une action vasodilatatrice et hypotensive alors que les nucléotides comme l'ATP, ont une activité vasoconstrictrice et hypertensive. Ces données suggéraient déjà à l'époque l'existence de différents récepteurs aux purines, sensibles à la fois au groupement adénine et à l'état de phosphorylation de la molécule. En 1964, Burnstock caractérise dans les neurones innervant le tractus intestinal une voie non adrénergique et non cholinergique dans laquelle le neurotransmetteur se révèle être l'ATP (Burnstock, G. *et al.*, 1964) et étend rapidement ses observations aux neurones innervant le système cardio-vasculaire (Burnstock, G., 1972). Ces travaux ouvrirent la voie à l'identification pharmacologique des récepteurs aux purines et aux pyrimidines (Fredholm, B.B. *et al.*, 1996). Le terme initial de récepteur purinergique, trop restrictif, a été abandonné au profit de la dénomination plus large de purinocepteur (Burnstock, G., 1978) que, par simplification, nous adopterons dans ce manuscrit. On sait aujourd'hui que ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de la plupart des grandes fonctions physiologiques et interviennent dans le système cardio-vasculaire, respiratoire, nerveux ou digestif (Ralevic, V. *et al.*, 1998).

Les purines participant à la régulation des fonctions biologiques ne se limitent pas à l'ATP, l'ADP, l'AMP ou l'Ado. Il existe dans les liquides extracellulaires des dinucléotides comme les A_p_nA , dans lesquels les deux groupements adénosine sont liés par une chaîne de 1 à 6 groupements phosphates (Pintor, J. *et al.*, 1997; Pintor, J. *et al.*, 1995). La fonction et les récepteurs de ces molécules restent cependant encore mal connus (Hoyle, C.H., 1990). Les purines peuvent également jouer un rôle régulateur en passant par d'autres voies. Il existe en effet de nombreuses enzymes capables de les transformer pour générer des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. C'est le cas de cyclases qui conduisent à la synthèse d'AMPc à partir d'ATP ou d'ADP-ribose cyclique (ADPRc) à partir du NAD. Les purines comme le NAD et l'ATP sont également impliquées dans des réactions conduisant à des modifications post-traductionnelles par l'intermédiaire de protéines kinases et de mono et poly ADP-ribosyl transférases dont l'importance dans le fonctionnement cellulaire n'est plus à démontrer (Burkle, A., 2001; Corda, D. *et al.*, 2002; Lupi, R. *et al.*, 2000). Comme on va le voir, ces activités enzymatiques ont plus récemment été mises en évidence à la surface des cellules, ouvrant une nouvelle ère dans le domaine de la pharmacologie des purines extracellulaires (Okazaki, I.J. *et al.*, 1996c; Okazaki, I.J. *et al.*, 1999; Redegeld, F.A. *et al.*, 1999). Les effets de ces purines vont être régulés par leur disponibilité dans les milieux biologiques mais aussi par des enzymes membranaires (ATPases, nucléotidases, NADases) capables de les dégrader. Ainsi le domaine des purines extracellulaires, pour aussi universel qu'il apparaisse est complexe à appréhender quant à son rôle et son fonctionnement du fait de la diversité des enzymes et des récepteurs présents à la surface des différents types cellulaires.

Une des questions importantes est l'origine des purines extracellulaires. Il ne fait pas de doute que leur libération résulte d'un processus physiologique dans le cas des neurones purinergiques. Dans les autres tissus, cette libération pourrait être la conséquence réactionnelle d'une modification de l'environnement cellulaire, d'un stress, voire de la mort des cellules. Il paraît évident que lors d'une lésion tissulaire, ces purines pourront être libérées ce qui soulève immédiatement la question de l'effet des purines sur les différents types cellulaires participant à l'immunité innée et acquise. Le prototype d'une telle situation est la réaction inflammatoire au cours de laquelle la production de radicaux libres, par exemple, entraîne une mobilisation des stocks d'ATP et de NAD mitochondriaux susceptibles d'être en

partie libérés dans le compartiment extracellulaire (Di Lisa, F. *et al.*, 2001; Lemasters, J.J. *et al.*, 1999). Le système immunitaire a pour rôle le maintien de l'intégrité de l'organisme. Il est composé de plusieurs catégories de cellules mobiles dont l'activité coordonnée permet à la réponse immune de se mettre en place dans l'espace et dans le temps. La coordination de ce système passe par un dialogue permanent des cellules entres-elles mais aussi avec les tissus qui composent les micro-environnements dans lesquels elles évoluent. La communication cellulaire s'établit en partie au travers d'interactions impliquant des contacts membranaires et de médiateurs solubles tels que les cytokines et chimiokines (Banyer, J.L. *et al.*, 2000; Yoshie, O. *et al.*, 2001). Cependant, des purinocepteurs et des enzymes capables de métaboliser les purines extracellulaires sont présents à la surface des lymphocytes T et B comme des macrophages ou des granulocytes. Il n'est donc pas surprenant que le fonctionnement du système immunitaire, comme ceux des autres systèmes biologiques de l'organisme, soit soumis à une régulation par les purines extracellulaires (Goding, J.W. *et al.*, 1998a). Cette régulation est au centre du travail que nous présentons, plus précisément consacré à l'effet du NAD extracellulaire sur les lymphocytes T murins. Avant d'envisager en détail les éléments aujourd'hui connus concernant l'influence des purines extracellulaires sur les fonctions immunes, il est nécessaire au préalable de présenter chacune des protéines susceptibles d'être en cause dans cette régulation.

1. Les récepteurs P1 et P2

1.1 Classification

La première classification proposée par Burnstock des récepteurs aux purines, divisait cette famille en deux : les « purinocepteur-P1 » principalement sensibles à l'adénosine et les « purinocepteur-P2 » sensibles à l'ATP et l'ADP (Burnstock, G., 1978). Cette division était basée essentiellement sur des données pharmacologiques. Cette classification initiale reste encore aujourd'hui à la base de la classification actuelle bien que les critères prennent

désormais en compte la structure des gènes correspondants. On distingue dorénavant les récepteurs à l'adénosine P1 couplés aux protéines G et les récepteurs P2 dont les ligands principaux sont l'ATP, l'ADP et, dans une moindre mesure, pour certains, l'UTP, l'UDP et des dinucléotides de type Ap_nA. Les récepteurs P2 sont eux-mêmes subdivisés en récepteurs P2Y, couplés comme les récepteurs P1 à des protéines G, et en récepteurs P2X qui forment, après activation, des canaux ioniques (Tableau n°1, page 11).

	Récepteurs P1	Récepteurs P2	
Ligands naturels	Adénosine	ATP, ADP, UTP, UDP, AP _n A	
Sous-groupes	-	P2Y	P2X
Types	Couplés aux protéines G	Couplés aux protéines G	Canaux ioniques
Sous-types	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃	P2X ₁₋₇

Tableau 1 : Classification des récepteurs aux purines et aux pyrimidines. D'après Ravelic V. *et al.* (Ralevic, V. *et al.*, 1998).

1.2 Les récepteurs P1

Les récepteurs P1 à l'adénosine comprennent les sous types A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ classés sur la base de données structurales, pharmacologiques et biochimiques (Tableau 2, page 18). Ces sous types présentent entre eux une homologie faible de l'ordre de 40% à 60% selon les espèces. Cette situation contraste avec celle des gènes orthologues, particulièrement bien conservés d'une espèce à l'autre, dont le degré d'homologie peut atteindre 95%.

Ces récepteurs appartiennent tous à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ils possèdent une topologie très

semblable avec une extrémité N-terminale extracellulaire, une région C-terminale cytoplasmique et une séquence intermédiaire de longueur variable contenant 7 hélices alpha conservées de 21 à 28 acides aminés qui constituent les domaines transmembranaires putatifs. Ces régions transmembranaires sont reliées par six boucles hydrophiles de longueur variable tour à tour intra- et extra- cytoplasmiques. La structure schématique du récepteur A₁ est illustrée sur la figure 1 (page 12).

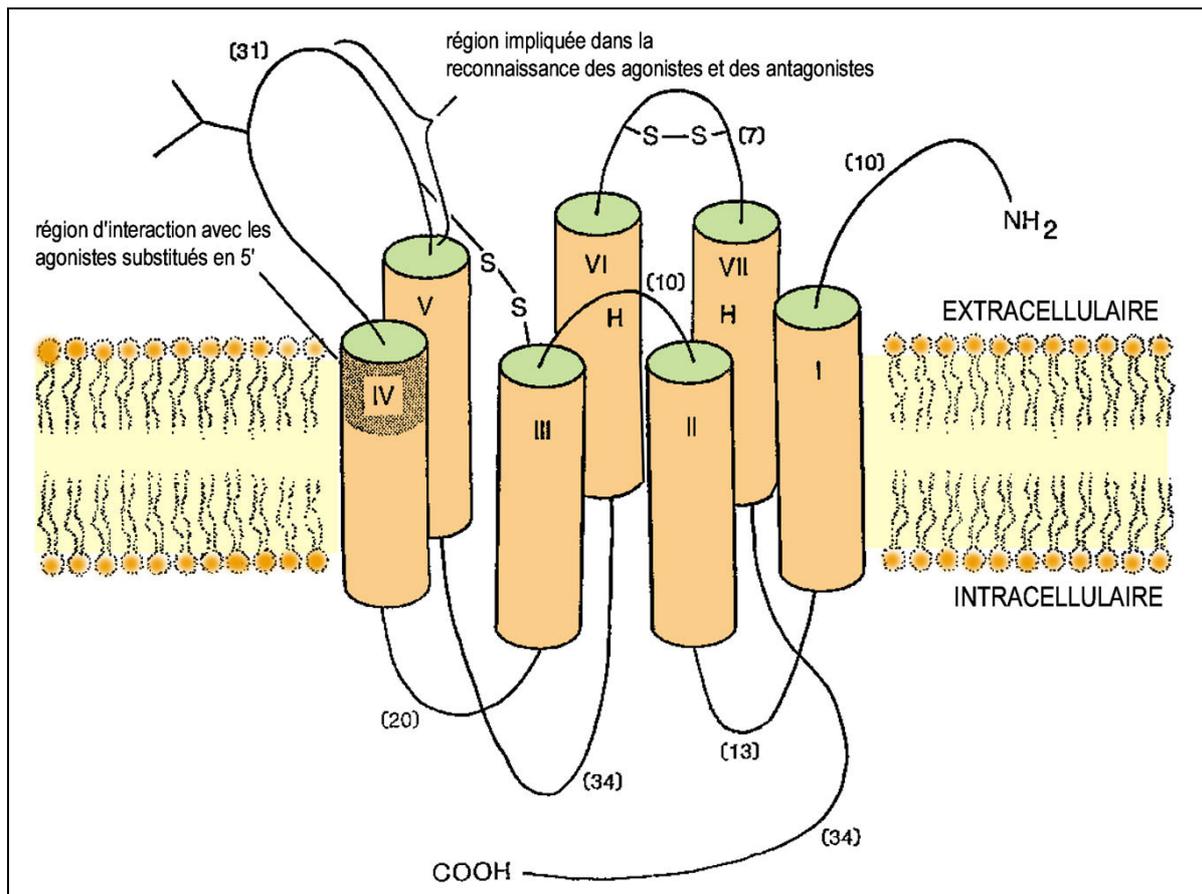


Figure 1: Représentation schématique du récepteur A₁. Les nombres entre parenthèses représentent la longueur en acides aminés de la boucle extracellulaire correspondante. Les histidines conservées, situées dans les deux derniers domaines transmembranaires, qui participent à la fixation des ligands sont notées "H". D'après Ravelic V. *et al.* (Ravelic, V. *et al.*, 1998).

La deuxième boucle extracellulaire entre les régions transmembranaires 4 et 5, de longueur plus importante, est peu conservée d'un sous-type de récepteur à l'autre (Tucker, A.L. *et al.*, 1993). Cette boucle se distingue par la présence de sites de N-glycosylation qui pourraient intervenir dans la protection contre les protéases et la stabilisation de la conformation. Toutefois, la glycosylation ne semble pas influencer la sensibilité aux ligands (Piersen, C.E. *et al.*, 1994).

La deuxième boucle extracellulaire est vraisemblablement impliquée dans la fixation spécifique des ligands (Olah, M.E. *et al.*, 1994) et semble responsable de la relative sélectivité aux analogues synthétiques, agonistes ou antagonistes (Tucker, A.L. *et al.*, 1993). La cavité dans laquelle le ligand se fixe serait formée de l'arrangement tridimensionnel des domaines transmembranaires et de cette boucle extracellulaire. La contribution exacte de cette boucle dans la fixation directe du ligand n'est pas connue mais elle pourrait néanmoins influencer la conformation globale du récepteur ou l'accessibilité de la poche aux ligands (Ralevic, V. *et al.*, 1998). Hors de cette région, des histidines fortement conservées situées dans les deux derniers domaines transmembranaires semblent impliquées dans la stabilisation et la reconnaissance de l'adénosine (Olah, M.E. *et al.*, 2000). Les autres boucles extracellulaires et les extrémités des récepteurs P1 ne paraissent pas participer à la fixation des ligands (Olah, M.E. *et al.*, 1995a; Ralevic, V. *et al.*, 1998).

1.2.1 Le récepteur A₁

Le récepteur A₁ a été cloné chez de nombreuses espèces. L'alignement des séquences montre une remarquable conservation du gène avec moins de 5% de variation entre le gène bovin et celui de l'Homme. Le récepteur A₁ est capable d'induire un large spectre de signaux intracellulaires principalement engendré par les différentes protéines G (G_{i-1}, G_{i-2}, G_{i-3} et G₀) auxquelles il est couplé (Freissmuth, M. *et al.*, 1991; Munshi, R. *et al.*, 1991). L'engagement du récepteur provoque une inhibition de la production d'AMPc. Ceci entraîne la modulation

de l'activité de kinases, dépendantes de l'AMPc, régulant ainsi l'activité de la cellule (Londos, C. *et al.*, 1980; Van Calker, D. *et al.*, 1978). L'activation de la phospholipase C (PLC) a également été rapportée en aval de l'activation du récepteur A₁. Elle conduit à la production d'inositol-3-phosphate (IP₃) et de diacyl-glycérol (DAG) capables de mobiliser le pool de calcium intracellulaire. La libération de ce calcium dans le cytoplasme stimule les protéines kinases C (PKC), la phospholipase A₂ ou l'oxyde nitrique synthétase (NOS) (Iredale, P.A. *et al.*, 1994; Megson, A.C. *et al.*, 1995; Peakman, M.C. *et al.*, 1995). Enfin, plusieurs types de canaux potassiques semblent couplés aux récepteurs A₁ notamment au niveau du muscle cardiaque et des neurones. Au niveau supra-ventriculaire, des canaux potassiques couplés aux récepteurs A₁ au travers des protéines G contribuent à la bradycardie induite par l'adénosine (Bunemann, M. *et al.*, 1995; Ito, H. *et al.*, 1995). D'autres types de canaux potassiques, K_{ATP}, ne s'ouvrent en réponse à l'adénosine que si la concentration intracellulaire d'ATP est faible. Dans les conditions d'ischémie où l'adénosine est libérée, le couplage de ces canaux avec le récepteur A₁ permet vraisemblablement de coordonner localement la demande énergétique et la perméabilité vasculaire (Dart, C. *et al.*, 1993; Ito, H. *et al.*, 1994).

Le récepteur A₁ est présent dans de nombreux tissus de l'organisme. Dans le système nerveux, ce récepteur est particulièrement bien représenté dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus, le cervelet et la moelle épinière. Sa stimulation a globalement pour effet de réduire l'activité neuronale et la consommation d'oxygène. L'adénosine, libérée dans des situations d'hypoxie ou d'ischémie, pourrait donc agir comme un agent neuroprotecteur au travers du récepteur A₁. Les messagers correspondants à ce récepteur ont aussi été détectés dans des tissus tels que la vessie, le rein, le testicule, le tissu adipeux, l'estomac, la rate, le foie, l'aorte et le cœur (Dixon, A.K. *et al.*, 1996; Reppert, S.M. *et al.*, 1991). Dans ces tissus, le rôle sélectif du récepteur A₁ reste encore mal défini (Ralevic, V. *et al.*, 1998).

1.2.2 Le récepteur A_{2A}

Contrairement au récepteur A₁ qui inhibe l'adénylate cyclase et la production subséquente de l'AMPc, le récepteur A_{2A} l'active. A_{2A} est considéré comme le récepteur de haute affinité à l'adénosine (CE ~ 1nM). Il s'agit d'une protéine de taille plus importante (45 kDa) que les autres sous-types P1 (35-37 kDa). La structure générale reste cependant identique. Ce récepteur possède une extrémité C-terminale plus longue d'une centaine d'acides aminés. Cette partie cytoplasmique ne semble pas établir d'interaction avec les protéines G et sa fonction reste à préciser (Piersen, C.E. *et al.*, 1994). L'interaction avec la protéine G_s s'établit plutôt au niveau de la troisième boucle cytoplasmique. Une désensibilisation artificielle de ce récepteur peut être réalisée en utilisant la toxine cholérique qui ADP-ribosyle la sous unité alpha des protéines G_s et inhibe ainsi son activité GTPasique. En général, l'activation du récepteur A_{2A} et la production d'AMPc qui en résulte stimulent les protéines kinases dépendantes de ce second messager. Dans certains cas, d'autres voies de signalisation indépendantes de l'AMPc ont pu être mises en évidence. Ainsi, dans les neutrophiles, A_{2A} semble stimuler directement des sérine/thréonine phosphatases et inhiber par cette voie la production de peroxydes et des molécules réactives dérivées de l'oxygène (ROS) (Revan, S. *et al.*, 1996).

Dans l'organisme, le récepteur A_{2A} est exprimé au niveau du système nerveux central, des muscles lisses, de l'endothélium vasculaire, des plaquettes et du système immunitaire. Dans le cerveau, son expression est particulièrement significative dans les régions riches en dopamine. Certaines données montrent que la stimulation du récepteur A_{2A} régule négativement la sensibilité du récepteur dopaminergique D₂ sans que les bases moléculaires soient clairement établies (Ferre, S. *et al.*, 1997). Dans le système vasculaire, l'excitation du récepteur A_{2A} est liée à un effet vasodilatateur. Son activation semble également antagoniste de l'effet protecteur des récepteurs A₁ et A₃ dans l'hypoxie en forçant probablement la production d'AMPc que ces deux derniers récepteurs tendent à inhiber (Strickler, J. *et al.*, 1996). Au niveau du système immunitaire l'adénosine, au travers de ce récepteur, régule la phagocytose, l'adhésion cellulaire, la production de molécules oxydées et la survie des

neutrophiles (Cronstein, B.N. *et al.*, 1994; Felsch, A. *et al.*, 1995; Walker, B.A. *et al.*, 1997b). Ce récepteur semble également inhiber l'agrégation des plaquettes (Ledent, C. *et al.*, 1997).

1.2.3 Les récepteurs A_{2B}

Le récepteur A_{2B} est le moins bien connu des récepteurs P1. Son étude est en effet plus difficile du fait de l'absence d'agoniste spécifique. A_{2B} a donc été caractérisé pharmacologiquement par défaut en se basant sur le profil de sensibilité aux agonistes spécifiques des autres récepteurs P1. Son affinité faible pour l'adénosine (Olah, M.E. *et al.*, 1995b) a également limité son analyse dans les cellules qui co-expriment plusieurs récepteurs P1. Son étude s'appuie sur l'existence d'un antagoniste qui malgré une affinité faible présente une bonne sélectivité : l'enprofylline (3-n-propylxanthine).

La signalisation en aval du récepteur A_{2B} passe principalement par l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc. Comme dans le cas du récepteur A_{2A}, le couplage s'effectue par l'intermédiaire des protéines G de type G_s. Un couplage avec un autre type de protéine G, G_{q/11}, a été rapporté dans les mastocytes humains et semble connecter ce récepteur à l'activation des PLC, la production d'IP3 et la libération des stocks calciques (Feoktistov, I. *et al.*, 1995).

Le récepteur A_{2B} est pratiquement présent sur toutes les cellules de l'organisme. Cependant, son expression reste faible dans la plupart des tissus. Des niveaux d'expression plus importants ont été détectés dans le tube digestif (Cæcum, gros intestin, colon) et la vessie mais les effets biologiques qui en découlent restent à caractériser. Au niveau vasculaire, l'excitation de ce récepteur, présent à la fois sur l'endothélium et les muscles lisses, provoque une vasodilatation (Rubino, A. *et al.*, 1995). Un autre effet biologique important, orchestré par le récepteur A_{2B}, est sa capacité à induire la dégranulation des mastocytes (Feoktistov, I. *et al.*, 1995). Le récepteur A_{2B} pourrait ainsi être impliqué dans les phénomènes allergiques et

les désordres inflammatoires. Cette hypothèse est confortée par l'effet anti-asthmatique de son inhibiteur le plus spécifique, l'enprofylline.

1.2.4 Les récepteurs A₃

Le récepteur A₃ lorsqu'il est stimulé, est couplé aux mêmes événements biochimiques que le récepteur A₁. Il est comme ce dernier lié aux protéines G_i mais aussi, à un degré moindre, aux protéines G_{q/11}. La stimulation de ces protéines G, suite à l'engagement du récepteur, inhibe l'adénylate cyclase, active la phospholipase C (PLC) et conduit à la libération des stocks calciques via l'inositol-3-phosphate (IP₃) et le Diacyl-glycérol (DAG) (Abbracchio, M.P. *et al.*, 1995; Ramkumar, V. *et al.*, 1993).

L'une des particularités de ce récepteur est la désensibilisation rapide, de l'ordre de la minute, qu'il subit après stimulation. Le mécanisme en cause serait la phosphorylation de la région C-terminale par une kinase associée aux protéines G qui conduirait au découplage du complexe (Palmer, T.M. *et al.*, 1996).

Le récepteur A₃ est tout aussi largement distribué que les autres sous-types de récepteurs dans les tissus de l'organisme. De manière intéressante, il semble que son niveau d'expression puisse augmenter lors de manifestations inflammatoires. Cette régulation positive a pu être observée dans les tissus pulmonaires et sur les éosinophiles de patients asthmatiques ainsi que chez des patients souffrant d'inflammation pulmonaire due au tabagisme (Walker, B.A. *et al.*, 1997a). L'intervention de ce récepteur dans la régulation des phénomènes inflammatoires est envisageable au travers de son action inhibitrice sur les fonctions des cellules de l'immunité innée. En effet, la stimulation du récepteur A₃ inhibe la production de TNF- α par les macrophages (Sajjadi, F.G. *et al.*, 1996), le recrutement, la dégranulation et la production de molécules oxydées par les éosinophiles (Ezeamuzie, C.I. *et al.*, 1999), ainsi que la dégranulation des neutrophiles (Bouma, M.G. *et al.*, 1997).

Aux fortes doses d'adénosine, le récepteur A₃ induit un processus apoptotique sur les éosinophiles, sur la lignée promyélocytaire HL60 et sur la lignée lymphocytaire U-937. Paradoxalement, les antagonistes de ce même récepteur A₃ induisent également l'apoptose (Kohno, Y. *et al.*, 1996; Yao, Y. *et al.*, 1997). Les auteurs de ce travail proposent une action autocrine protectrice de l'adénosine libérée en faible quantité par la cellule et une action délétère de celle-ci lorsqu'elle est libérée en quantité plus importante dans des situations pathologiques et inflammatoires.

	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Couplé aux protéines G de type :	G _{i/o}	G _s	G _s G _q	G _i G _q
Effet sur la production d'AMPc	Inhibition	Stimulation	Stimulation	Inhibition
Autres effets	PLC ↑, IP ₃ ↑, [Ca ²⁺] ↑, PKC ↑, PLA ₂ ↑, PLD ↑, canaux K ⁺ ↑	[Ca ²⁺] ↑, canaux K ⁺ ATP ↑	PLC ↑, IP ₃ ↑, [Ca ²⁺] ↑	PLC ↑, IP ₃ ↑, [Ca ²⁺] ↑
Sensibilité à l'adénosine (CE)	3-30 nM	1-20 nM	5000-20000 nM	1000-30000 nM
Tissus où le récepteur est fortement exprimé	cortex cérébrale, cervelet, thalamus, moelle épinière, testicules, tissus adipeux, estomac, rate, cœur, aorte, foie, vessie, bulbe oculaire	bulbe olfactif, corps strié (<i>striatum</i>), cœur, muscles squelettiques, poumon, vessie, utérus, bulbe oculaire, plaquettes	cæcum, gros intestin, vessie, colon	Testicules, poumon, foie
Tissus où le récepteur est faiblement exprimé	poumon, reins, intestin grêle	cerveau, intestin grêle, reins, rate, thymus, estomac, testicules, peau, foie	cerveau, bulbe oculaire, poumon, utérus, aorte, cœur, estomac, testicules, muscles squelettiques, reins, rate, foie	Cerveau, reins, placenta, cœur, aorte, rate, utérus, vessie, colon, intestin grêle, bulbe oculaire

Tableau n°2 : Classification, propriétés et distribution des récepteurs P1 à l'adénosine chez le rat. D'après Ravelic V. *et al.*, et Fredholm B. *et al.* (Fredholm, B.B. *et al.*, 1994; Ravelic, V. *et al.*, 1998).

1.3 Les récepteurs P2

Les récepteurs P2 sont subdivisés en deux sous-classes : les récepteurs P2Y couplés, comme les récepteurs P1, aux protéines G et les récepteurs P2X qui, suite à leur activation, forment des canaux ioniques. A ce jour, sept récepteurs P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ et P2Y₁₃) et sept récepteurs P2X (P2X₁ à P2X₇) ont été clonés et caractérisés sur le plan pharmacologique. La compréhension des fonctions biologiques de ces récepteurs reste incomplète. Elle est entravée par des difficultés liées à la diversité de cette famille de récepteur, à l'expression de plusieurs de ces récepteurs à la surface d'une même cellule, à la présence de nombreuses ecto-enzymes hydrolysant leur substrat et à l'absence d'agonistes et d'antagonistes rigoureusement sélectifs.

1.3.1 Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont des protéines de 41 à 53 kDa qui, comme les récepteurs P1 appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La structure schématique des récepteurs P2Y est similaire à celle des récepteurs P1 (Figure 2, page 20). Cependant, contrairement aux récepteurs P1, les récepteurs P2Y ne sont pas sensibles à l'adénosine mais à des nucléotides comme l'ATP et l'ADP, voire l'UTP et l'UDP (Tableau 3, page 22). De même le site de fixation aux purines est différent de celui des P1. Il met en cause des acides aminés chargés positivement qui interagissent avec les groupements phosphates par des liaisons ioniques. Ces résidus ont été identifiés par mutagenèse dirigée dans les régions transmembranaires 3, 6 et 7. La mutation de ces résidus diminue très significativement l'affinité de ces récepteurs pour leurs ligands (Erb, L. *et al.*, 1995; Jiang, Q. *et al.*, 1997).

La plupart des récepteurs P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ et P2Y₁₁) sont couplés à des protéines G dont la stimulation conduit principalement à l'activation de la PLC. L'activité enzymatique de la PLC provoque la génération d'IP₃ et de DAG. Cette cascade d'événements converge ensuite vers la libération des stocks calciques et la régulation de l'activité des MAP

kinases (Patel, V. *et al.*, 1996). Néanmoins, il existe parfois certaines particularités fonctionnelles. Ainsi, le récepteur P2Y₁₁, parallèlement à la stimulation de la PLC, semble aussi couplé à la stimulation de l'adénylate cyclase et à la production d'AMPc. Les récepteurs P2Y₁₂ et P2Y₁₃ semblent eux couplés aux protéines G_i dont l'activité inhibe l'adénylate cyclase et la production subséquente d'AMPc. Ces voies de signalisation sont résumées dans le tableau 3 (page 22). Parallèlement à ces voies majeures, d'autres voies de signalisation ont été rapportées en aval de certains récepteurs P2Y. Ainsi dans le cas du récepteur P2Y₁, un couplage direct entre le récepteur et certains canaux potassiques a été rapporté (Ikeuchi, Y. *et al.*, 1996; Webb, T.E. *et al.*, 1996). Toutefois, l'utilisation de ces voies de signalisation parallèles semble dépendre du type cellulaire (Ralevic, V. *et al.*, 1998).

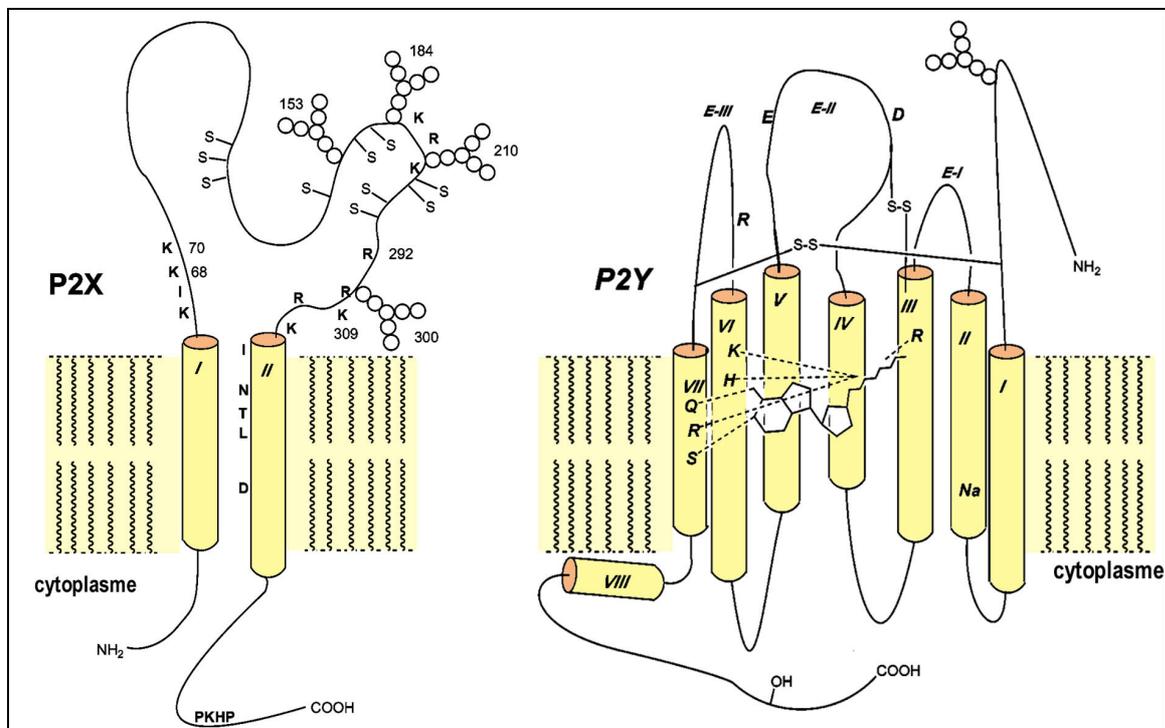


Figure 2: Représentation schématique de la structure des récepteurs P2X et P2Y. Les acides aminés conservés qui participent à la fixation des ligands ou à la conformation des récepteurs P2X et du récepteur P2Y₁ humain sont indiqués. D'après Jacobson K.A. *et al.* (Jacobson, K.A. *et al.*, 2002).

Les récepteurs P2Y sont largement distribués dans les différents tissus de l'organisme. Leur présence a été notamment documentée dans le système cardio-vasculaire, dans les tissus nerveux, sur les muscles lisses et dans les tissus lymphoïdes (Tableau 3, page 22). Leur rôle régulateur reste encore à préciser bien que certaines fonctions soient mieux connues aujourd'hui. Leur intervention dans la régulation des fonctions immunes sera considérée un peu plus loin dans cette étude. L'importance de ces récepteurs sera illustrée ici dans un seul exemple, donné à titre indicatif, celui de l'agrégation plaquettaire. Dans ce processus physiologique, l'ADP joue un rôle essentiel. En présence d'ADP libéré par les cellules lésées, deux récepteurs P2Y collaborent activement au processus d'agrégation plaquettaire nécessaire à la coagulation. Dans un premier temps, les plaquettes répondent à la présence de l'ADP par une réorganisation rapide du cytosquelette. Ce changement morphologique implique et requiert la présence du récepteur P2Y₁ (Hechler, B. *et al.*, 1998; Jin, J. *et al.*, 1998). Dans un second temps, l'activation du récepteur P2Y₁₂ conduit au phénomène final d'agrégation. Cette réponse du P2Y₁₂ mobilise les protéines G_i dont la stimulation va inhiber l'adénylate cyclase et libérer les stocks calciques intracellulaires (Hourani, S.M. *et al.*, 1996). En plus de ces deux récepteurs P2Y, le récepteur P2X₁ semble également contribuer au changement morphologique nécessaire à l'agrégation plaquettaire (Sage, S.O. *et al.*, 1990). L'agrégation plaquettaire constitue un exemple intéressant de régulation impliquant les récepteurs P2. Elle illustre une réponse intégrée à des concentrations localement élevées de nucléotides puriques mettant en cause plusieurs récepteurs P2 exprimés par la même cellule. Il est aussi remarquable de noter que l'ADP, catalyseur de cette réponse, est d'abord libéré par les cellules de l'endothélium en état de stress mais qu'il est ensuite sécrété par les plaquettes activées qui participent ainsi à l'amplification du signal. Les vésicules denses de ces plaquettes contiennent en effet une large quantité (de l'ordre du millimolaire) d'ATP et d'ADP (Lages, B. *et al.*, 1999). L'importance de cette voie de régulation est illustrée par l'efficacité clinique anti-thrombogène des thienopyridines antagonistes du récepteur P2Y₁₂ (Bennett, J.S., 2001).

	<i>couplé aux protéines G :</i>	<i>effecteurs</i>	<i>ligands naturels</i>	<i>distribution (principaux tissus)</i>
P2Y₁	G _{q/11}	PLC ↑	ADP ≥ ATP	cerveau, endothélium vasculaire, plaquettes
P2Y₂	G _{q/11}	PLC ↑	UTP = ATP	cellules épithéliales, muscles lisses de l'endothélium
P2Y₄	G _{q/11}	PLC ↑	UTP > ATP	placenta, poumon
P2Y₆	G _{q/11}	PLC ↑	UDP > UTP > ADP	muscles lisses, épithélium des voies respiratoires
P2Y₁₁	G _q G _s	PLC ↑, AMP _c ↑	ATP > ADP	rate, intestin, foie, granulocytes
P2Y₁₂	G _i	AMP _c ↓	ADP	cellules gliales, moelle épinière, plaquettes
P2Y₁₃	G _i	AMP _c ↓	ADP	rate, cerveau, ganglions lymphatiques, moelle osseuse

Tableau 3 : Classification, propriétés et distribution des récepteurs P2Y.
D'après Ravelic V. *et al.*, Jacobson K. *et al.*, et Burnstock G. *et al.* (Burnstock, G. *et al.*, 2000; Jacobson, K.A. *et al.*, 2002; Ravelic, V. *et al.*, 1998).

1.3.2 Les récepteurs P2X

1.3.2.1 Présentation générale des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont tous des canaux ioniques dont l'ouverture est dépendante de la présence du ligand, essentiellement l'ATP, dans le milieu extracellulaire. A ce jour, 7 gènes ont été clonés codant pour les protéines P2X₁ à P2X₇. La structure schématique des protéines qui forment ces canaux est présentée dans la figure 2 (page 20). Elles sont composées de deux régions transmembranaires hydrophobes, d'une boucle extracellulaire, et de deux extrémités N- et C- terminales cytoplasmiques. Cette structure de base correspond à celle des sous-unités. Le récepteur fonctionnel est en effet vraisemblablement constitué de trois sous-unités qui s'associent pour former des homo- ou hétéro-polymères. D'après des expériences de transfection *in vitro*, la plupart des P2X peuvent former des homomères (Collo, G. *et al.*, 1996). Toutefois, ce ne semble pas être le cas de P2X₆ dont l'existence à l'état homomérique

in vivo est actuellement remise en question (Khakh, B.S. *et al.*, 2001). Cependant, cette protéine P2X₆ peut participer à la formation d'hétéromères P2X_{4/6} et P2X_{2/6}. A l'inverse, P2X₇ ne semble former que des homomères. Au total, les études biochimiques ont révélé jusqu'à 11 types d'hétéropolymères P2X distincts dans les modèles cellulaires mais leurs propriétés fonctionnelles et leur pertinence physiologique restent encore à clarifier (Khakh, B.S. *et al.*, 2001).

Par comparaison avec les récepteurs P2Y et P1 couplés aux protéines G, la réponse des récepteurs P2X, caractérisée par une dépolarisation membranaire est très rapide et de l'ordre de 10 ms. Suite à leur stimulation, les récepteurs P2X deviennent sélectivement perméables aux cations Na⁺, K⁺ et Ca²⁺. La dépolarisation membranaire qu'ils induisent peut conduire à l'activation secondaire de canaux calciques voltage dépendant. Dans le cas du P2X₇, l'influx calcique engendré directement ou indirectement par l'activation du récepteur régule l'activité de kinases calcium dépendantes et en aval de celles-ci, des MAP kinases ERK1 et ERK2 (Gendron, F.P. *et al.*, 2003). L'activation de ces MAP kinases a des effets variés qui dépendent du type cellulaire (Ralevic, V. *et al.*, 1998).

La stimulation prolongée de certains récepteurs P2X, provoque la formation d'un pore plus large et peu sélectif permettant le passage de molécules de taille plus importante. Cette particularité a longtemps été considérée comme une propriété unique au récepteur P2X₇. Il semble aujourd'hui que l'activation chronique des récepteurs P2X₂ et P2X₄ puisse également conduire à la formation d'un pore membranaire peu sélectif (Khakh, B.S. *et al.*, 1999; Virginio, C. *et al.*, 1999). Les propriétés des récepteurs P2X et leur distribution dans l'organisme sont résumées dans les tableaux 4 et 5 (pages 24 et 25). Le récepteur P2X₇, qui possède d'autres propriétés particulières, sera considéré séparément dans la section suivante.

	nombre d'acide aminée	événements induis suite à la stimulation du récepteur	distribution
P2X ₁	399	influx cationique dépolariation membranaire	muscles lisses
P2X ₂	472	influx cationique dépolariation membranaire formation d'un pore membranaire peu sélectif	neurones sensoriels, cerveau, pancréas
P2X ₃	397	influx cationique dépolariation membranaire	neurones sensoriels de la douleur
P2X ₄	288	influx cationique dépolariation membranaire formation d'un pore membranaire peu sélectif	cerveau, testicules, colon
P2X ₅	417	influx cationique dépolariation membranaire	cœur, médullosurrénale
P2X ₆	379	influx cationique dépolariation membranaire	cerveau
P2X ₇	595	influx cationique dépolariation membranaire formation d'un pore membranaire peu sélectif activation PLD, activation caspase 1 et 3 activation kinases JNK, induction NF-κB induction de l'apoptose	lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules giales, mastocytes, fibroblastes

Tableau 4 : Classification, propriétés et distribution des récepteurs P2X.
Daprès Ravelic V. et al. 1998-50, Jacobson K. et al., 2002-45 ; Burnstock G. et al., 2000-295 et Di Virgilio et al., 2001-97.

Parmi les molécules naturelles, l'ATP est l'agoniste des récepteurs P2X le plus efficace. Toutefois, certaines molécules synthétiques modifiées sur la partie ribose ou le groupement triphosphate de l'ATP sont de meilleurs agonistes que l'ATP, d'autres ont des propriétés antagonistes. Bien qu'aucune de ces molécules ne soit sélective, chaque récepteur possède une sensibilité à ces analogues qui lui est propre. Ainsi, il est possible de les distinguer fonctionnellement en comparant leurs profils pharmacologiques (Tableau 5, page 25).

	Agonistes	Antagonistes (IC₅₀)	désensibilisation
P2X₁	2-MeSATP ≥ ATP > α,β-meATP > BzATP	TNP-ATP 6 nM NF023 200 nM PPADS 1 μM Suramine 1 μM	rapide
P2X₂	2-MeSATP > ATP > BzATP	NF023 100 nM TNP-ATP 1 μM PPADS 1 μM Suramine 10 μM	lente formation d'un pore
P2X₃	2-MeSATP > ATP ≥ α,β-meATP	TNP-ATP 1 nM NF023 1 μM PPADS 1 μM Suramine 3 μM	rapide
P2X₄	ATP > 2-MeSATP >> α,β-meATP	TNP-ATP 15 μM NF023 > 100 μM PPADS > 300 μM Suramine >300 μM	lente formation d'un pore
P2X₅	ATP ≥ 2-MeSATP > ADP	PPADS 3 μM Suramine 4 μM	lente
P2X₆	ATP > 2-MeSATP > ADP	-	lente
P2X₇	BzATP >> ATP ≥ 2-MeSATP >> ADP	KN-62 50 nM * TNP-ATP 30 μM PPADS 50 μM oATP 100 μM ** Suramine 500 μM	lente formation d'un pore

Tableau 5 : Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs P2X.

* l'IC₅₀ du KN-62 s'applique ici au récepteur humain, le KN-62 est inactif sur le récepteur P2X₇ de rat et inhibe les fonctions du récepteur de souris à des concentrations plus élevées (IC₅₀ =10 μM).

** l'oATP agit comme un antagoniste sur les récepteurs P2X₁, P2X₂ et P2X₇. Cependant, la préincubation avec l'oATP (1-2 h) prévient irréversiblement des effets de l'ATP sur le seule récepteurs P2X₇.

D'après Ravelic V. *et al.*, Jacobson K. *et al.*, Burnstock G. *et al.*, North AR. & Surprenant A., et Khakh B. *et al.* (Burnstock, G. *et al.*, 2000; Jacobson, K.A. *et al.*, 2002; Khakh, B.S. *et al.*, 2001; North, R.A. *et al.*, 2000; Ravelic, V. *et al.*, 1998).

1.3.2.2 Le récepteur P2X₇

Un récepteur à l'ATP aux propriétés singulières avait été décrit à la surface des mastocytes en 1980 (Cockcroft, S. *et al.*, 1980). Ce récepteur, initialement dénommé « P_{2Z} » fut ensuite caractérisé à la surface d'autres cellules d'origines hématopoïétiques telles que les macrophages ou les lymphocytes. Des études fonctionnelles réalisées sur ces cellules soulignèrent certaines particularités de ce récepteur. En premier lieu, il apparaît posséder une sensibilité faible à l'ATP et ne répond qu'à des concentrations de l'ordre de 100µM. Ensuite, dans certaines conditions, il est capable de former un pore membranaire peu sélectif dont l'ouverture perméabilise la cellule à des molécules pouvant atteindre 900 Da. Enfin, il a tendance à orienter la cellule vers un processus de mort par apoptose lorsqu'il est stimulé de manière prolongée par l'ATP, ce qui lui confère une activité cytolytique.

Ce récepteur a été cloné chez le rat puis chez l'homme à partir de lignées de macrophages et fut identifié comme le récepteur P2X₇ (Rassendren, F. *et al.*, 1997; Surprenant, A. *et al.*, 1996). Son expression a été principalement détectée sur les cellules d'origine hématopoïétique (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes) et sur un nombre limité d'autres tissus dont les fibroblastes, les mastocytes et les cellules gliales. Sa structure de base est similaire à celle des autres P2X avec deux régions transmembranaires et une boucle extracellulaire impliquée dans la liaison aux ligands. Toutefois, son extrémité C-terminale est significativement plus longue avec 240 acides aminés comparée à 28 acides aminés pour P2X₄ et 118 pour P2X₂.

Cette région cytoplasmique de la protéine semble responsable des propriétés particulières du récepteur P2X₇. En effet, la construction d'un récepteur présentant une délétion des 177 derniers acides aminés montre que celui-ci perd sa capacité à former un pore membranaire alors qu'il conserve sa capacité à former un canal cationique en réponse à son activation (Surprenant, A. *et al.*, 1996). Plus récemment, des études de comparaison de séquence ont montré que cette région C-terminale contient une séquence présentant une forte homologie avec le « domaine de mort » du récepteur au TNF (TNR-Death Domain), mais

aussi une région susceptible d'interagir avec les domaines SH3 (SH3-binding motif) et enfin des motifs comparables à ceux connus pour se lier aux LPS (LPS binding domain) (Denlinger, L.C. *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que cette région cytoplasmique puisse permettre au récepteur P2X₇ d'établir des contacts avec d'autres partenaires par l'intermédiaire de ces domaines putatifs d'interactions. Cette possibilité est d'autant plus séduisante que l'existence d'interactions avec de nombreuses autres protéines a pu tout récemment être proposée. En effet, des expériences d'immunoprécipitation ont révélé que la protéine P2X₇ est associée à 11 autres protéines (Kim, M. *et al.*, 2001). Ces interactions conduiraient ainsi à la formation d'un vaste complexe fonctionnel (Figure 3, page 28). Les protéines interagissant avec la protéine P2X₇, sont la laminine α -3, l'intégrine β -2, la β -actine, la supervilline, la protéine MAGuK, 3 protéines de choc thermique (Hsp 71, 90 et Hsc 70), une phosphatase (RPTP- β), qui serait responsable de la désensibilisation du récepteur et enfin la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) qui pourrait intervenir dans la transduction des signaux. La PI4K catalyse en effet la phosphorylation en position 4 du phosphatidylinositol (PI) et intervient dans la première étape de synthèse de l'IP₃ qui, en coopération avec le diacylglycérol (DAG) permet, entre autres, de libérer les stocks intracellulaires de calcium. La génération d'un autre dérivé du PI, le PIP₂ permet également de proposer un mécanisme plausible d'activation de la phospholipase D (PLD). L'activation de celle-ci a en effet été rapportée suite à la stimulation du récepteur P2X₇ (Humphreys, B.D. *et al.*, 1996). D'autres données démontrent l'existence d'un lien entre la stimulation du récepteur P2X₇ et l'activation des caspases 1 et 3, l'induction de NF- κ B et l'activation des kinases JNK sensibles au stress (stress-activated Protein Kinase/JNK) (Coutinho-Silva, R. *et al.*, 1999; Ferrari, D. *et al.*, 1999; Ferrari, D. *et al.*, 1997b; Humphreys, B.D. *et al.*, 2000). Une interaction de la protéine EMP-2 (epithelial membrane protein 2) avec la région C-terminale de P2X₇ a récemment été décrite (Wilson, H.L. *et al.*, 2002). Cette protéine semble connecter la stimulation du récepteur P2X₇ à l'induction de la formation des vésicules membranaires plus connue sous la terminologie anglo-saxonne de « blebbing » et généralement associée à l'apoptose. Ce processus pourrait jouer un rôle important en immunologie en participant à la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL1- β . Dans les macrophages, il est maintenant bien acquis que la stimulation du P2X₇ induit l'activation de la caspase 1 qui catalyse le clivage du précurseur de l'IL1- β et la production de la forme mature (Brough, D. *et al.*, 2003; Ferrari, D. *et al.*, 1997a). Cette

cytokine ne possède pas de signal de sécrétion et le mécanisme qui permet sa libération dans le milieu extracellulaire ne peut pas emprunter les voies classiques de sécrétion. Une étude récente menée par MacKenzie et ses collaborateurs suggère que le « blebbing » puisse permettre la libération de cette cytokine au travers de vésicules membranaires (MacKenzie, A. *et al.*, 2001). Ainsi, l'activation de P2X₇ participerait non seulement à la maturation de l'IL1-β mais aussi à sa sécrétion. Globalement, le récepteur P2X₇ semble capable de générer plusieurs voies de signalisation parallèles impliquant la dépolarisation membranaire et l'influx calcique, commun à tous les récepteurs P2X, mais aussi l'activation de protéines connexes.

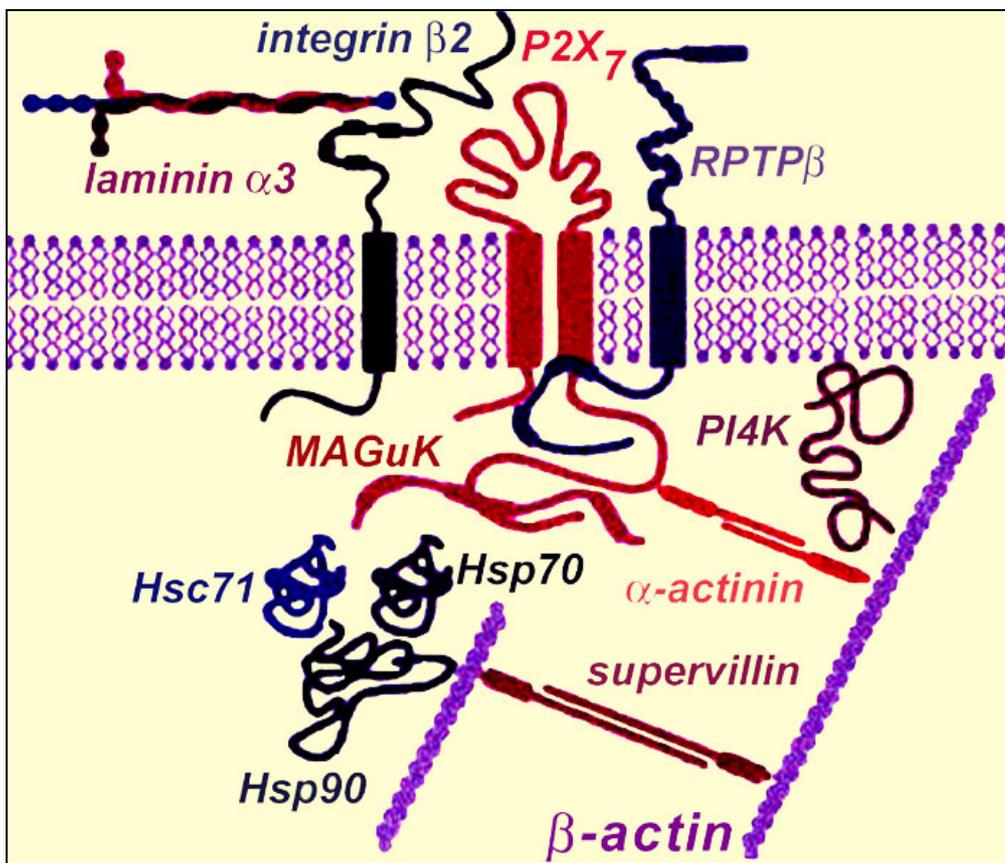


Figure 3: Représentation schématique du complexe protéique impliquant la protéine P2X₇. D'après Kim M. *et al.* (Kim, M. *et al.*, 2001).

2. Les ecto-enzymes spécifiques des purines

Il est maintenant bien établi que les purines extracellulaires participent à la communication cellulaire et interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. La multiplicité et la diversité des récepteurs P1 et P2 en sont une illustration. L'abondance et la persistance des molécules dotées d'une activité biologique déterminent l'intensité de la réponse cellulaire et le degré de désensibilisation de leurs récepteurs.

On sait aujourd'hui qu'il existe de nombreuses ecto-enzymes capables de dégrader les purines extracellulaires, ce qui, de nouveau, milite en faveur d'un rôle important de ces molécules dans la régulation des fonctions biologiques. L'ATP est en général rapidement transformé en ses dérivés di- et mono-phosphatés puis en adénosine. Dans le compartiment extracellulaire, la demi-vie de l'ATP est de l'ordre de la seconde (Banerjee, R.K., 1981). Les ecto-nucléotidases contrôlent ainsi la disponibilité des ligands qui se fixent sur les récepteurs P1 et P2. Ces enzymes assurent aussi le maintien à l'état actif de ces récepteurs en limitant leur désensibilisation.

Ces ecto-enzymes participent également au recyclage des purines. La synthèse complète des nucléotides tri-phosphates par la voie de synthèse *de novo* est coûteuse puisqu'elle nécessite 36 molécules d'ATP. La synthèse d'ATP par recyclage des nucléosides (« salvage pathway ») ne coûte que 4 molécules d'ATP. Les nucléosides extracellulaires peuvent être réabsorbés par des transporteurs de type équilibratif et concentratif (Cass, C.E. *et al.*, 1998). En participant à la transformation des nucléotides extracellulaires en nucléosides, ces ecto-enzymes favorisent la capture de ces molécules essentielles au métabolisme énergétique comme à la synthèse des acides nucléiques. Cette voie de recyclage est importante pour les lymphocytes en phase de prolifération dont la demande en nucléosides est particulièrement élevée. Pour faire face à cette demande, les lymphocytes T activés se mettent d'ailleurs à exprimer un transporteur de nucléosides de type concentratif (Kichenin, K. *et al.*, 2000).

Enfin, certaines enzymes utilisent les purines extracellulaires pour réaliser des réactions de modifications post-traductionnelles de protéines membranaires. Dans cette catégorie, on reconnaît aujourd'hui des ecto-protéines kinases qui ont comme substrat l'ATP mais dont le rôle est mal inconnu (Redegeld, F.A. *et al.*, 1999) et des mono-ADP-ribosyl transférases (ART) qui utilisent le NAD (Haag, F. *et al.*, 1997; Okazaki, I.J. *et al.*, 1996c). Le rôle de ces dernières dans la régulation des fonctions cellulaires est l'objet du présent travail.

Beaucoup de ces ecto-enzymes sont exprimées dans la plupart des tissus mais nous nous limiterons ici aux activités et aux fonctions de celles qui sont clairement exprimées sur les cellules du système immunitaire. Parmi elles, on peut distinguer plusieurs familles : les nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), la 5'-nucléotidase, les nucléotides pyrophosphatases (E-NPP), l'adénosine déaminase (E-ADA), les NADases /ADP-ribosyl cyclases, les protéines kinases et les mono-ADP-ribosyl transférases (ART) (Tableau 6, page 31).

Famille	Sous-type	Activité
ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase)	NTPDase1 (CD39, ecto-apyrase)	NTP → NMP + 2Pi NDP → NMP + Pi
	NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase)	NTP → NDP + Pi
	NTPDase3 (CD39L3, ecto-ATPase)	NTP → NDP + Pi NDP → NMP + Pi
	NTPDase5 (CD39L4)	NDP → NMP + Pi
ecto-5'-nucléotidase	CD73	AMP → adénosine + Pi
ecto-nucléotides pyrophosphatase / phosphodiesterase (E-NPP)	NPP1 (PC-1)	NTP → NMP + PPi AMPc → AMP
	NPP2 (Autotaxin)	NTP → NMP + PPi AMPc → AMP ATP → ADP + Pi ADP → AMP + Pi AMP → adénosine + Pi PPi → 2 Pi
	NPP3 (CD203c)	NTP → NMP + PPi AMPc → AMP
ecto-adénosine déaminase	ecto-ADA	Adénosine → inosine + NH ₃ 2'-déoxyadénosine → 2'-déoxyinosine + NH ₃
ecto-NADase / ADP-ribosyl cyclase	CD38 CD157	NAD(P) → ADPR(P) + Nico NAD(P) → ADPR(P) cyclique + Nico ADPR(P) cyclique → ADPR(P) + H ₂ O ADPRP + acide nicotinique → NAADP
ecto-protéine kinase	ecto-PK	protéine + ATP → protéine-P + ADP
ecto-monoADP-ribosyl transférase	ART	protéine + NAD → protéine-ADPR + Nico

Tableau 6 : Propriétés des principales ecto-enzymes exprimées à la surface des cellules immunitaires. D'après Zimmermann H., et Goding JW. & Howard MC. (Goding, J.W. *et al.*, 1998a; Zimmermann, H., 2000).

2.1 Les ecto-enzymes catabolisant les purines libres extracellulaires

2.1.1 Les ecto-nucléosides triphosphates diphosphohydrolases :

E-NTPDase

Les E-NTPDases correspondent à une famille d'enzymes retrouvées dans toutes les espèces animales et végétales. Elles catalysent principalement la dégradation de l'ATP et de l'ADP en AMP mais peuvent aussi, dans une moindre mesure, hydrolyser d'autres NTP et NDP. Les différents membres de cette famille possèdent des préférences à la fois pour les substrats (NTP et/ou NDP) et pour le choix de la liaison di-phosphate hydrolysée (γ - β , β - α) (Tableau 6, page 31). Les NTPDases1-4 sont des protéines à deux domaines trans-membranaires possédant une large boucle extracellulaire. Sur cette boucle, on peut reconnaître 5 séquences conservées qui semblent propres à cette famille d'enzyme et participent probablement à l'activité catalytique (Yang, F. *et al.*, 2001). La E-NTPDase5 ne possède qu'un seul domaine trans-membranaire. Cette dernière peut être clivée de la membrane et être libérée sous forme soluble dans les liquides biologiques (Mulero, J.J. *et al.*, 1999). D'une manière générale, l'activité de ces enzymes *in vitro* semble dépendante de fortes concentrations en ions divalents (Hicks-Berger, C.A. *et al.*, 2000).

Avant la classification actuelle basée sur les données génétiques et fonctionnelles, les enzymes étaient classées en se basant uniquement sur leurs activités. Ainsi, l'ecto-ATPase correspondait à l'activité catalysant l'hydrolyse de l'ATP en ADP. On distinguait alors deux autres classes d'enzymes ; les ecto-ADPases hydrolysant seulement l'ADP et les ecto-ATP/ADPases hydrolysant l'ATP et l'ADP. L'ecto-ATPase telle qu'elle était définie correspond dans la classification actuelle aux E-NTPDase2 et E-NTPDase3. Une activité ecto-ATPase a été détectée à la surface de nombreuses cellules d'origines hématopoïétiques et notamment à la surface des lignées de lymphocytes CD4⁺, des cellules cytotoxiques CD8⁺, des lymphocytes B activés et des cellules NK activées par l'IL-2 (Dombrowski, K.E. *et al.*, 1998). Les lymphocytes naïfs ne présentent pas d'activité détectable. Sur ces cellules,

l'expression de cette activité enzymatique semble en corrélation avec l'état d'activation et l'acquisition des fonctions effectrices (Di Virgilio, F. *et al.*, 1990; Filippini, A. *et al.*, 1990).

Parallèlement, l'utilisation d'anticorps monoclonaux montre que la protéine CD39, la NTPDase1 de la classification actuelle, est aussi un marqueur d'activation des lymphocytes B, des lymphocytes T, des cellules NK, des cellules dendritiques et des cellules endothéliales (Maliszewski, C.R. *et al.*, 1994). Il apparaît cependant que certains anticorps anti-CD39 ne sont pas sélectifs et reconnaissent plusieurs isoformes de cette famille d'enzyme. Il reste donc possible que la protéine détectée dans ces études ne corresponde pas à la E-NTPDase1 (CD39) mais à l'une ou l'autre des E-NTPDases (CD39, CD39L1, CD39L3 et CD39L4). Il est enfin possible que ces cellules expriment à leur surface plusieurs de ces enzymes (Kannan, S., 2002; Zimmermann, H., 2000).

Plus récemment l'identité exacte des enzymes exprimées par certains types cellulaires a pu être précisée. Ainsi au niveau de l'épiderme, les cellules dendritiques (cellules de Langerhans) sont les seules à exprimer la NTPDase1 (CD39) et cette enzyme est entièrement responsable de l'activité ATP/ADPase détectée dans ce tissu (Mizumoto, N. *et al.*, 2002). Dans un autre cas, il a pu être montré que les macrophages humains expriment la NTPDase5. Celle-ci est d'ailleurs en partie sécrétée par le macrophage et retrouvée dans le sérum sous forme active (Mulero, J.J. *et al.*, 1999).

2.1.2 L'ecto-5'-nucléotidase : CD73

CD73 catalyse la déphosphorylation des purines et des pyrimidines mono-phosphates en leurs nucléosides correspondants. L'AMP est cependant le meilleur substrat de cette ectoenzyme (Tableau 6, page 31). CD73 est une protéine de 70 kDa ancrée à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un groupement phosphatidyl-inositol glycosylé (GPI). Dans le système immunitaire, cette ectoenzyme a été détectée à la surface des lymphocytes T et B, des

cellules dendritiques folliculaires, des fibroblastes et des cellules épithéliales de la médulla thymique (Resta, R. *et al.*, 1998). Sur les lymphocytes, l'expression de CD73 est régulée et dépend du stade de différenciation. Alors que les lymphocytes thymiques immatures n'expriment pas CD73, en périphérie 50% des lymphocytes CD8⁺ et 10% des lymphocytes CD4⁺ humains l'expriment. De même, 75% des lymphocytes B matures expriment CD73 (Airas, L., 1998; Yamashita, Y. *et al.*, 1998).

Deux fonctions peuvent être attribuées à CD73. Son activité participe au recyclage des purines en transformant l'AMP extracellulaire en adénosine capable d'être capturée par la cellule au travers des transporteurs de nucléosides (Cass, C.E. *et al.*, 1998). D'autre part, d'un point de vue pharmacologique, l'activité de CD73 régule localement la disponibilité en adénosine et, indirectement, l'activation des récepteurs P1.

2.1.3 Les ecto-nucléotides pyrophosphatases / phosphodiesterases : E-NPP

On connaît aujourd'hui trois protéines correspondant à la famille des E-NPP : NPP1 (PC-1), NPP2 (Autotaxin) et NPP3 (CD203c). Leur structure générale ressemble à celle de la E-NTPDase 5 avec un seul domaine transmembranaire (Goding, J.W. *et al.*, 1998b). Comme elle aussi, ces enzymes peuvent être libérées par clivage protéolytique et se retrouver sous forme libre dans les liquides biologiques (Bollen, M. *et al.*, 2000). Ces ecto-enzymes possèdent une activité pyrophosphatase sur les nucléotides. Elles catalysent principalement l'hydrolyse des NTP en NMP en libérant un pyrophosphate. Cependant, elles possèdent également une activité phosphodiesterase leur permettant de catalyser la réaction d'hydrolyse de l'AMPc en AMP. L'une de ces enzymes, la E-NPP2, possède une activité enzymatique encore plus large puisqu'elle hydrolyse également l'ATP en ADP, ADP en AMP et l'AMP en adénosine (tableau 6, page 31). Les E-NPP seraient enfin capables de cliver le NAD en AMP et nicotinamide-mononucléotide (Deterre, P. *et al.*, 1996; Goding, J.W., 2000; Goding, J.W. *et al.*, 1998b).

La distribution de ces enzymes dans le système immunitaire est peu connue. Cependant, des formes solubles de l'E-NPP1 et de l'E-NPP2 existent dans le sérum et limitent probablement l'activité des purines extracellulaires sur les cellules lymphoïdes circulantes. Ces enzymes solubles sont également détectées en forte concentration dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrite (Cardenal, A. *et al.*, 1998). L'enzyme la mieux caractérisée à la surface des cellules immunitaires est la E-NPP1 plus connue sous le nom de PC-1. Cette ectoenzyme a été détectée à la surface des cellules B et T activées et sur les macrophages (Goding, J.W. *et al.*, 1998b; Van Driel, I.R. *et al.*, 1985).

Il peut être noté que l'activation des lymphocytes permet, dans certaines conditions, d'induire l'expression coordonnée d'enzymes qui concourent au recyclage des purines. Pour exemple, les esters de phorbol ou les drogues stimulant la synthèse d'AMPc permettent d'induire l'expression de CD38 (NAD glycohydrolase), de PC-1 et d'une activité 5'-nucléotidase sur les lymphocytes T humains (Deterre, P. *et al.*, 1996). En présence de NAD, l'activité de ces enzymes participe à la formation d'adénosine qui seule peut être réabsorbée par la cellule. Dans ce cas précis, il a été montré que ces lymphocytes activés pouvaient recycler le NAD extracellulaire alors que les lymphocytes non activés en étaient incapables.

2.1.4 L'ecto-adénosine déaminase : ecto-ADA

L'ecto-adénosine déaminase (ecto-ADA) participe au métabolisme des purines en catalysant la transformation de l'adénosine (ou du déoxy-adénosine) en inosine ou en déoxy-inosine (Tableau 6, page 31). Cette ecto-ADA est présente sur la surface de la majorité des monocytes et des cellules B et sur 20% des lymphocytes T où son expression semble liée à l'activation (Martin, M. *et al.*, 1993). Cette enzyme à localisation ecto-membranaire est codée par le même gène que l'ADA intracellulaire dont le défaut d'expression congénital conduit, chez l'homme, à un déficit immunitaire combiné et sévère (SCID) résultant d'une perturbation précoce du développement des thymocytes (Lluis, C. *et al.*, 1998). La protéine de 41 kDa,

produit de ce gène, ne possède pas de région trans-membranaire ni même de peptide signal et son mode de sécrétion n'est pas connu. Cependant, une fois libérée, l'ADA s'associe de manière spécifique à certaines protéines ecto-membranaires. CD26, une ecto-peptidase, est la principale protéine servant d'ancrage à l'ADA (Franco, R. *et al.*, 1998). Plus récemment, les récepteurs à l'adénosine A_1 et A_{2B} ont été identifiés comme des partenaires alternatifs (Ciruela, F. *et al.*, 1996; Herrera, C. *et al.*, 2001). Le rôle physiologique de l'ecto-ADA dans le système immunitaire reste encore à éclaircir. Cependant, en transformant l'adénosine en inosine, cette enzyme participe au control de la concentration extracellulaire en adénosine, ligand des récepteurs P1. Son activité pourrait ainsi protéger les thymocytes de la toxicité de l'adénosine. En effet, en présence d'inhibiteurs de l'ADA, l'adénosine induit la mort des thymocytes par apoptose (6 à 15%) et inhibe l'activation passant par le TCR de la majorité des cellules immatures $CD4^+CD8^+$ (Apasov, S. *et al.*, 2000). En s'appuyant sur différents modèles de souris invalidées pour les gènes codant pour les récepteurs P1, les auteurs montrent que le récepteur A_{2A} est responsable de la toxicité directe de l'adénosine. Par contre, la signalisation par le TCR n'est que partiellement rétablie chez les souris $A_{2A}^{-/-}$ suggérant l'implication d'autres facteurs. La toxicité de l'adénosine en absence d'ADA est susceptible de contribuer à l'altération du développement normal de la différenciation des thymocytes chez les patients souffrant d'un immunodéficit sévère causé par le défaut de cette enzyme (Apasov, S.G. *et al.*, 2001; Thompson, L.F. *et al.*, 2000; Van De Wiele, C.J. *et al.*, 2002).

2.1.5 Les ecto-NADases / ADP-ribosyl cyclases : CD38 et CD157

Les ecto-enzymes CD38 et CD157 catalysent l'hydrolyse du NAD en ADP-ribose et en nicotinamide. *In vitro*, ces enzymes catalysent aussi, dans une plus faible proportion, la formation d'ADP-ribose cyclique (3%) lorsque le NAD est présent à des concentrations saturantes. Ces enzymes suivent le schéma catalytique des $NAD(P)^+$ -glycohydrolases dans lesquelles l'intermédiaire réactionnel, l'ADP-ribose* se lie de manière covalente à l'enzyme. Il est ensuite libéré soit par réaction avec H_2O , introduisant un groupement OH sur le ribose en

position 1, soit plus exceptionnellement par cyclisation résultant de la formation d'une liaison C-N entre le carbone 1 du ribose et la position N¹ de l'adénine. L'étape de cyclisation de l'ADP-ribose est réversible ce qui permet aussi à ces enzymes de catalyser la réaction d'hydrolyse de l'ADP-ribose cyclique. En présence de concentrations élevées d'acide nicotinique de l'ordre de 10 mM, ces enzymes peuvent également transformer le NAD(P)⁺ en NAAD(P)⁺ par une réaction d'échange. Les réactions enzymatiques catalysées par CD38 sont résumées sur le schéma de la figure 4 (page 37). Au final, le mécanisme catalytique de ces enzymes permet de les considérer comme d'authentiques NAD-glycohydrolases (Berthelie, V. *et al.*, 1998; Cakir-Kiefer, C. *et al.*, 2001).

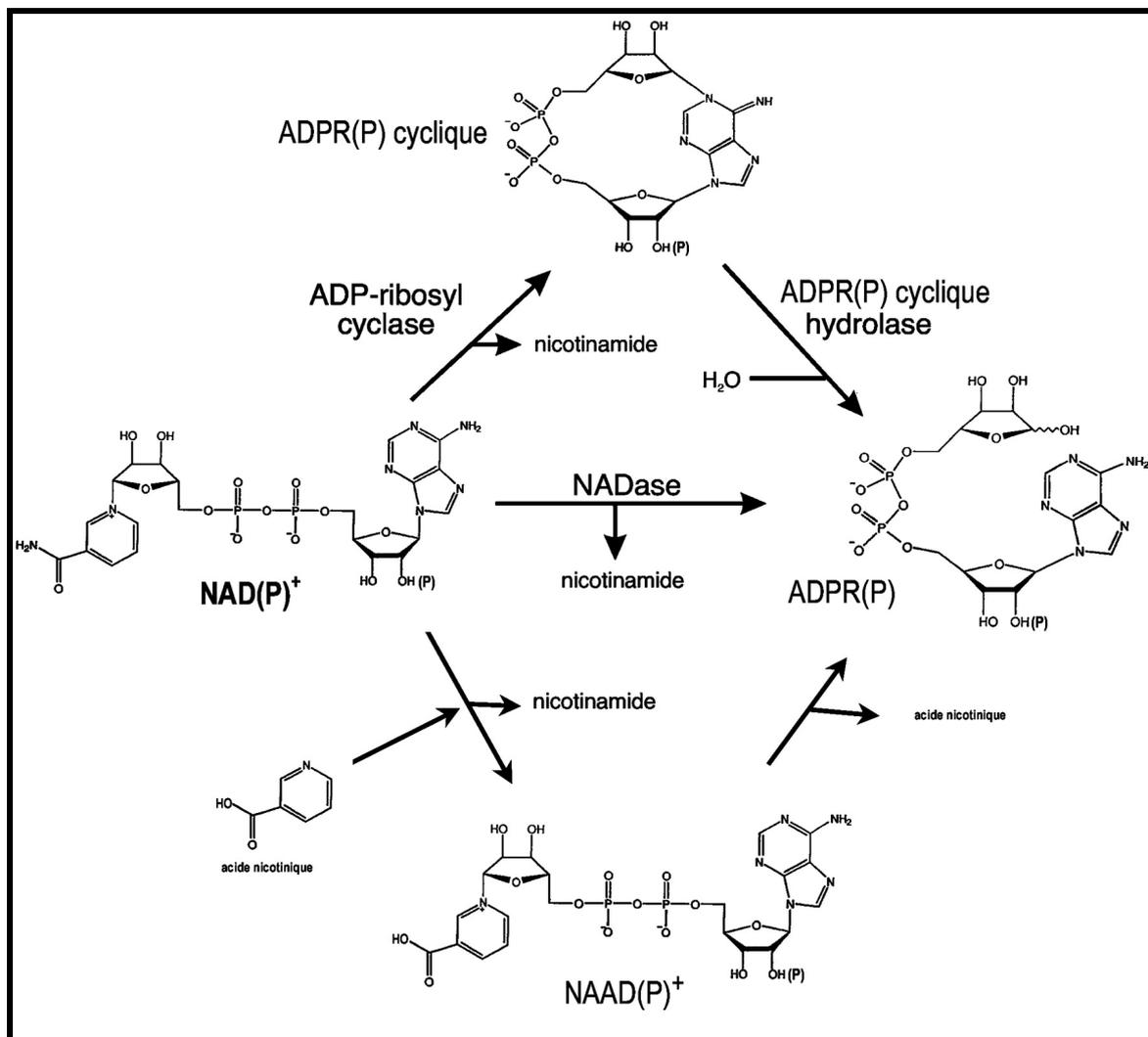


Figure 4: Réactions catalysées par CD38 et CD157.

L'organisation du gène codant pour CD157 est similaire à celui codant pour CD38 ce qui indique une parenté phylogénique entre les deux molécules (Ferrero, E. *et al.*, 1999). D'ailleurs, CD157 possède vraisemblablement les mêmes activités enzymatiques que CD38 encore qu'elles soient moins efficaces (Adebanjo, O.A. *et al.*, 2000; Ortolan, E. *et al.*, 2002). En effet, CD157 diffère de CD38 par son activité catalytique 100 fois moins importante et par sa liaison à la membrane plasmique par un groupement glypié (Ortolan, E. *et al.*, 2002). Peu de données existent aujourd'hui quant à son rôle biologique. Cette enzyme semble s'exprimer durant les phases précoces du développement des lymphocytes B et T et sur les cellules matures du lignage myéloïde. Les cellules réticulées qui se trouvent dans les ganglions lymphoïdes, la rate et les plaques de Peyer expriment également CD157. La distribution de cette enzyme suggère son implication dans le développement des réponses immunitaires. Cette hypothèse semble corroborée par le phénotype des souris CD157^{-/-} qui présentent un défaut de production d'IgG3 en réponse aux antigènes T indépendants et d'IgA suite à une immunisation orale par la toxine cholérique (Itoh M., et al., 1998 -161). Ces résultats suggèrent que l'expression de CD157 soit nécessaire au développement normal des réponses immunitaires, notamment au niveau des muqueuses.

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type II avoisinant les 45 kDa et dont 20% de la masse est constituée par des sucres. Au niveau du système immunitaire, CD38 semble jouer un rôle important comme en témoignent sans doute sa large distribution sur les cellules hématopoïétiques et la régulation fine de son expression. Chez l'Homme, CD38 est exprimé par les cellules T et B immatures puis son expression décline dans les lymphocytes matures en périphérie. Toutefois l'activation de ces lymphocytes coïncide avec une ré-expression de CD38 particulièrement significative pour les cellules B qui sont engagées dans les centres germinatifs. La répartition de CD38 diffère quelque peu chez la souris. Chez cette espèce, les lymphocytes B expriment faiblement CD38 tout au long de leur différenciation mais fortement au stade mature. Contrairement à ce que l'on peut observer chez l'Homme, l'activation de ces lymphocytes B dans les centres germinatifs est en corrélation avec une forte réduction de niveau d'expression de CD38 à la surface membranaire. Dans les lymphocytes T

murins, l'enzyme est exprimée par une faible fraction des thymocytes et par seulement 5 à 20% des lymphocytes T matures correspondant vraisemblablement aux cellules ayant un phénotype activé (Deterre, P. *et al.*, 2000; Lund, F. *et al.*, 1995).

L'expression de CD38 peut varier dans les conditions pathologiques. CD38 est, par exemple, fortement exprimé sur les lymphocytes T des patients atteints du SIDA et constitue même un facteur pronostique de l'évolution de la maladie (Liu, Z. *et al.*, 1997). Certains facteurs influençant le niveau d'expression de CD38 ont pu être mis en évidence. Parmi eux, les dérivés de la vitamine A tels que l'acide rétinoïque (ATRA), les métabolites de la vitamine D3, les interférons ($\text{IFN}\alpha,\beta,\gamma$) et les facteurs qui stimulent la production d'AMPc sont de puissants inducteurs. Des séquences sensibles à l'acide rétinoïque (DR-5) ou aux interférons (IRF-1) régulant la transcription du gène codant pour CD38 ont été caractérisées en amont de celui-ci. D'autres facteurs régulent négativement son expression. C'est le cas de l'IL-4 dans certaines lignées de cellules B *in vitro* (Lund, F.E. *et al.*, 1998). De manière plus surprenante, l'exposition au NAD, substrat de l'enzyme, ou à des composés réducteurs comme le DTT semble promouvoir une internalisation de CD38 participant ainsi à la modulation de sa densité à la surface cellulaire (Zocchi, E. *et al.*, 1995; Zocchi, E. *et al.*, 1999).

2.2 Les ectoenzymes catalysant des modifications post-traductionnelles des protéines membranaires à partir des purines extracellulaires

2.2.1 Les ecto-protéines kinases

La phosphorylation des protéines par des protéines-kinases ayant comme substrat l'ATP est un phénomène bien connu intervenant dans la signalisation intracellulaire et la régulation des fonctions cellulaires (Hsueh, R.C. *et al.*, 2000; Isakov, N. *et al.*, 1994). Ce n'est que plus récemment que des ecto-protéines kinases capables de phosphoryler des protéines membranaires en présence d'ATP ont été décrites à la surface des cellules (Tableau 6, page

31). Les fonctions de ces ecto-protéines kinases restent encore mal connues en partie pour des raisons méthodologiques. Au delà de toute controverse sur leur existence, il paraît probable que de telles enzymes puissent réguler les fonctions des protéines membranaires et participer à la communication intercellulaire (Ehrlich, Y.H. *et al.*, 1986; Ehrlich, Y.H. *et al.*, 1987).

L'activité ecto-kinase a été détectée sur un grand nombre de cellules comme les fibroblastes mais aussi sur les cellules de l'immunité telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T et les mastocytes (Dusenbery, K.E. *et al.*, 1988; Redegeld, F.A. *et al.*, 1999). Les effets de ces phosphorylations sur la régulation des fonctions immunes restent à éclaircir. Cependant, il est intéressant de noter que des protéines aussi importantes que le TCR ou la protéine du complément C1s ont été proposées comme des cibles de ces enzymes (Apasov, S.G. *et al.*, 1996; Geberhiwot, T. *et al.*, 1997).

2.2.2 Les mono-ADP-ribosyl transférases (ART)

Les poly-ADP-ribose polymérase (PARP) représentent une famille grandissante de protéines intracellulaires intervenant dans la régulation de la réparation de l'ADN, la transcription des gènes, l'induction de l'apoptose, la séparation des chromosomes durant la mitose, le fonctionnement des télomérases ou celui des centrioles (Burkle, A., 2001; Herceg, Z. *et al.*, 2001; Ziegler, M. *et al.*, 2001). Ces enzymes catalysent une première réaction de O-glycosylation en fixant un ADP-ribose sur des résidus glutamates de protéines cibles puis catalysent la synthèse de chaînes de poly-ADP-ribose linéaires ou branchées pouvant atteindre 250 monomères. Ce n'est que plus récemment que des mono-ADP-ribosyl transférases ont été décrites à la surface des cellules eucaryotes (Haag, F. *et al.*, 1998; Okazaki, I.J. *et al.*, 1996c; Okazaki, I.J. *et al.*, 1999). Ces ART, contrairement aux PARP, catalysent des réactions de type N-glycosylation en fixant un groupement ADP-ribose sur des arginines (Figure 5, page 42). Cette modification post-traductionnelle provoque le plus souvent l'inhibition des fonctions de la protéine cible (Koch-Nolte, F. *et al.*, 2001). L'activité ART est, en réalité, connue depuis longtemps. Elle correspond en effet à l'activité de certaines toxines bactériennes telles que la toxine de *B. pertussis*, la toxine diphtérique ou la toxine

cholérique pour ne citer qu'elles (Tableau 7, page 42). Ces toxines sont capables de perturber le métabolisme des cellules de l'hôte en ADP-ribosylant certaines protéines cibles spécifiques (Krueger, K.M. *et al.*, 1995; Lahiri, S.S., 2000). Par exemple, l'ADP-ribosylation de la sous unité α des protéines G par la toxine cholérique conduit à l'activation chronique de l'adénylate cyclase et à l'accumulation d'AMP cyclique responsable de la modification de l'équilibre ionique et de la déhydratation (Popoff, M.R., 1998). D'autres toxines ADP-ribosylent des facteurs de transcription ou des protéines du cytosquelette. Ces toxines procaryotes, chacune au moyen d'une stratégie qui lui est propre, doivent pénétrer dans la cellule pour exercer leur effet. Les ART eucaryotes, à la différence, sont des protéines extracellulaires qui affectent des cibles membranaires. Ces ART ont été décrites chez l'homme, le singe, le rat, la souris et le poulet. On en connaît aujourd'hui 7 isoformes chez les vertébrés, ce qui témoigne sans doute de leur importance biologique (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1997a). Ces ART sont des protéines d'environ 40 kDa. Chez la souris la classification de ces enzymes se décompose en 6 isoformes appelées respectivement ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4 et ART5. La comparaison des séquences protéiques correspondantes montre que ces différentes enzymes possèdent entre elles un degré de similitude modeste compris entre 28 et 40% sauf entre l'ART2.1 et l'ART2.2 où le degré de similitude atteint 85%. D'une espèce à l'autre les séquences des orthologues sont en revanche bien conservées avec des degrés d'homologie compris entre 75 et 83% (Braren, R. *et al.*, 1998; Glowacki, G. *et al.*, 2002; Kanaitzuka, T. *et al.*, 1997; Koch-Nolte, F. *et al.*, 1997b). Chez l'Homme, il n'existe pas d'équivalent des ART2 murins. Le seul gène correspondant est en effet un pseudogène contenant 3 signaux précoces de terminaison de la traduction (Glowacki, G. *et al.*, 2002; Haag, F. *et al.*, 1998).

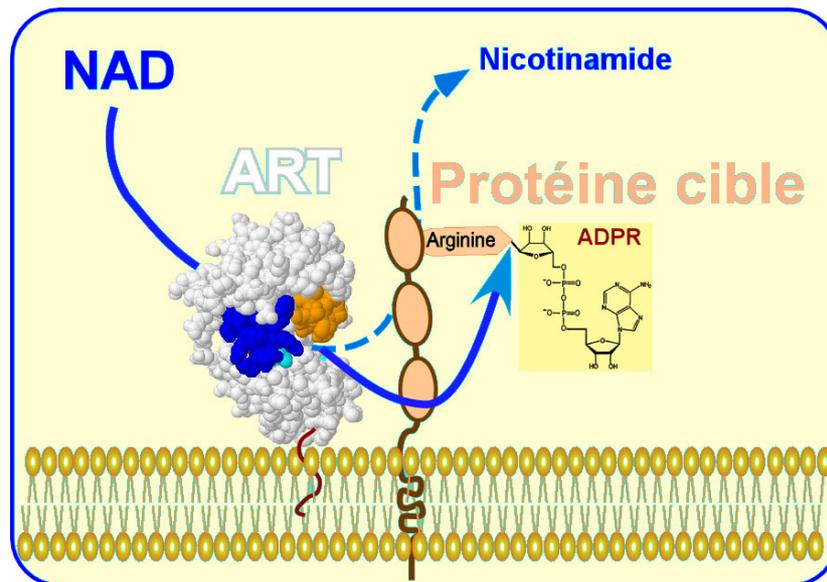


Figure 5: Représentation schématique de la réaction de monoADP-ribosylation

Nom ou origine de la toxine	Cibles	Effets
Toxine diphtérique	EF-2	Inhibition de la synthèse des protéines
<i>Pseudomonas ETA</i>	EF-2	Inhibition de la synthèse des protéines
<i>Pseudomonas ExoS</i>	Vimentine, Ras	Cytotoxicité
Toxine cholérique	G _s , G _t	Inhibition de l'activité GTPasique des protéines G
<i>Escherichia coli LT</i>	G _s , G _t	Inhibition de l'activité GTPasique des protéines G
Toxine de Pertussis	G _i , G _o , G _t	Découplage des protéines G de leur récepteur
<i>Salmonella enterica</i> (serovar <i>Typhimurium SpvB</i>)	actine	Inhibition de la polymérisation de l'actine
<i>C. botulinum C2</i> (toxine iota)	actine	Inhibition de la polymérisation de l'actine
<i>C. botulinum C3</i> <i>Clostridium limosum</i> <i>Bacillus cereus VIP2</i>	Rho, Rac	Désorganisation du cytosquelette
<i>Staphylococcus aureus EDIN</i>	Rho	Désorganisation de l'appareil de Golgi

Tableau 7: Propriétés des exo-toxines bactériennes possédant une activité ADP-ribosyl transférase. D'après Pallen MJ. *et al.* (Pallen, M.J. *et al.*, 2001).

La structure des gènes codant pour ces différentes enzymes est très similaire avec un large exon codant pour l'intégralité du domaine catalytique et deux exons en positions 5' et 3' codant respectivement pour la séquence signal et pour le site d'insertion du groupement glypié de type GPI (Glycosyl-phosphatidyl inositol) servant à la protéine d'ancrage à la membrane (Figure 7, page 45). Le gène codant pour l'ART5 ne possède pas cette séquence hydrophobe C-terminale, ce qui vaut à cette enzyme d'être sécrétée plutôt que membranaire (Glowacki, G. *et al.*, 2002; Okazaki, I.J. *et al.*, 1999). En dépit de leur séquence primaire très différente de celle des ART procaryotes, les enzymes des vertébrés présentent une organisation secondaire très proche de celle de toxines bactériennes (Domenighini, M. *et al.*, 1996; Koch-Nolte, F. *et al.*, 1996b). La cristallisation de l'ART2 de rat a permis de constater la remarquable conservation entre l'organisation tridimensionnelle de cette enzyme et celles de la toxine diphtérique ou de la protéine VIP2 de *Bacillus cereus* (Mueller-Dieckmann, C. *et al.*, 2002) (Figure 6, page 43).

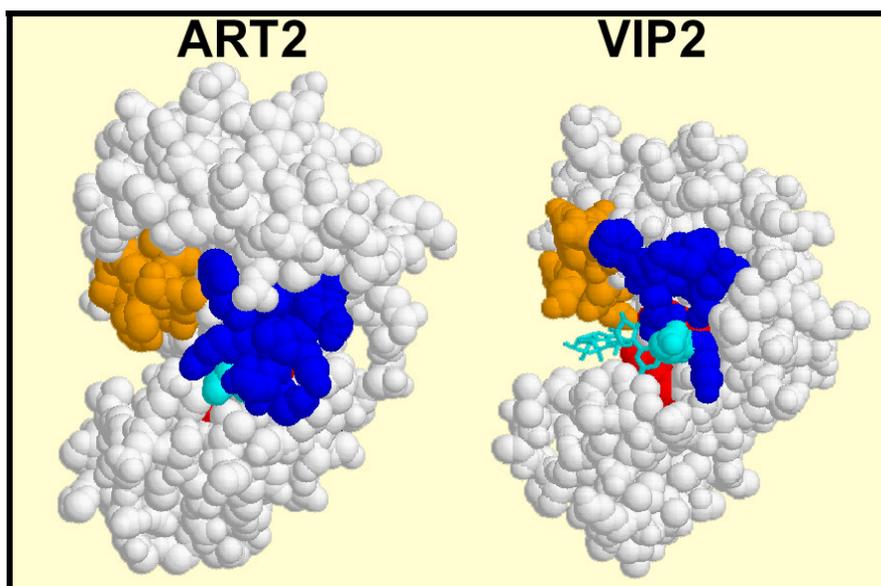


Figure 6: Homologie entre la structure tridimensionnelle de l'ART2 de rat et de la toxine VIP2 (*Bacillus cereus*). Les acides aminés conservés caractéristiques des arginine-ADP-ribosyl transférases sont colorés en rouge (motif R-S-EXE), l'acide glutamique impliqué dans la réaction enzymatique est coloré en bleu cyan, les acides aminés appartenant à l'hélice α bordant la poche catalytique sont colorés en marron et les acides aminés situés dans la boucle impliquée dans la reconnaissance des cibles de l'ADP-ribosylation sont colorés en bleu. Les acides aminés appartenant aux six feuillets β qui forment les planchers inférieur et supérieur de la poche catalytique ne sont pas colorés. D'après Mueller-dieckmann C. *et al.* (Mueller-Dieckmann, C. *et al.*, 2002).

Bien que ces enzymes soient toutes issues d'un gène ancestral commun, leurs activités enzymatiques ne sont pas équivalentes. L'ART1 et l'ART2.2 possèdent une activité ADP-ribosyl transférase très efficace comparée à celle de l'ART3 et de l'ART4. L'ART2.1, bien que très proche du point de vue séquence à l'ART2.2, possède une activité très faible dans des conditions expérimentales standards. Cependant, son activité est très fortement stimulée dans des conditions réductrices à forte concentration de DTT (Hara, N. *et al.*, 1999). Enfin, l'ART5 possède une activité NAD hydrolase supérieure à son activité transférase (Okazaki, I.J. *et al.*, 1996b). Son auto-ADP ribosylation semble cependant stimuler son activité transférase *in vitro* (Weng, B. *et al.*, 1999). Enfin, tandis que les ART procaryotes exercent leur activité toxique en ADP-ribosylant spécifiquement une seule cible, les ART eucaryotes ont la capacité d'ADP-ribosyler de multiples protéines membranaires (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1996a). On ignore aujourd'hui les éléments structuraux responsables de la sélectivité des ART procaryotes. De même, chez les vertébrés, alors que les sites de N-glycosylation ou de mannosylation des protéines sont bien connus, aucune séquence spécifique entourant les arginines cibles des ART n'a pu être encore déterminée.

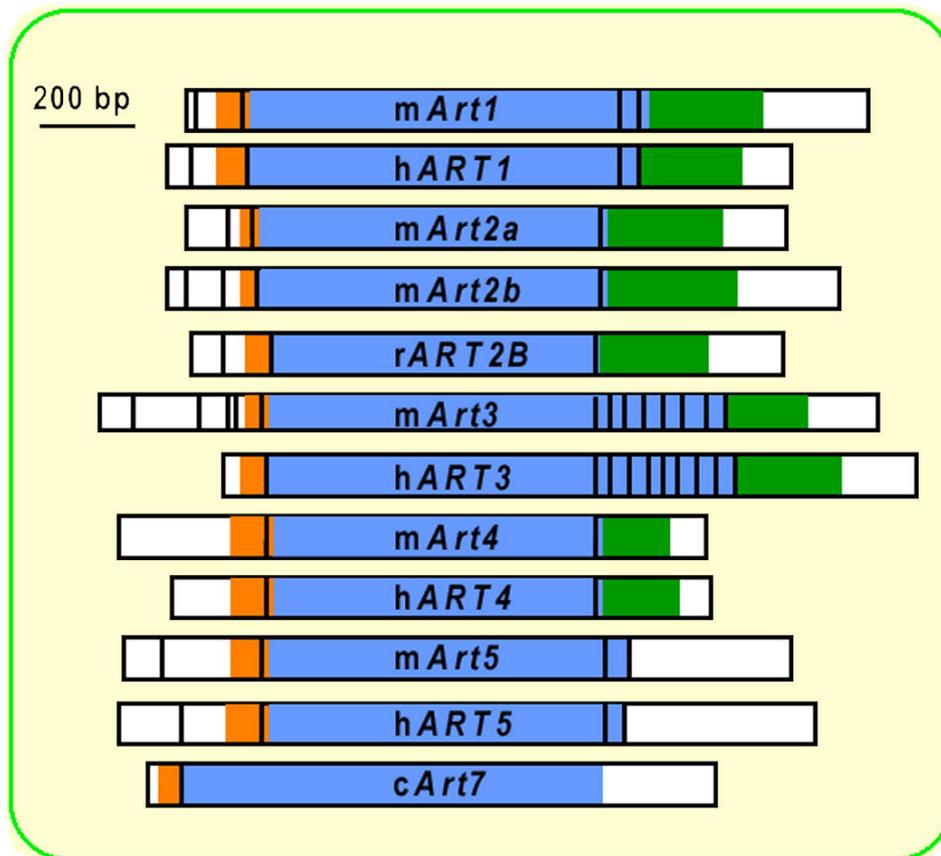


Figure 7: Comparaison schématique de la structure des ADNc codant pour les ART des mammifères et du poulet. Chacun des exons composant le transcrit majoritaire est représenté par un rectangle. Les régions en 5' et en 3' du gène qui ne sont pas traduites en acides aminés sont représentés en blanc, le peptide signal est coloré en orange, le reste de la protéine est coloré en bleu sauf pour la région hydrophobe, codant pour le site d'insertion du groupement GPI, représentée en vert. D'après Glowacki G. *et al.* (Glowacki, G. *et al.*, 2002).

L'expression des ART n'est pas ubiquitaire et est restreinte, pour chacune d'entre elles, à certains tissus. Chez la souris, L'ART1 est détectée principalement dans les muscles squelettiques et le cœur, les ART2 dans les tissus lymphoïdes, l'ART3 et l'ART5 dans les testicules et l'ART4 dans le cœur (Glowacki, G. *et al.*, 2002). Chez l'Homme, cette distribution est essentiellement conservée sauf pour l'ART4 dont les messagers sont détectés dans les tissus lymphoïdes et la moelle osseuse mais pas dans le cœur. Sur les cellules du système immunitaire, l'ART1 a été détectée sur les neutrophiles humains (Donnelly, L.E. *et*

al., 1996; Kefalas, P. *et al.*, 1998); l'ARNm des ART3 et ART4 dans les macrophages murins (Grahner, A. *et al.*, 2002) ; et les ART2 sur les lymphocytes T de rat et de souris. Alors que le rat n'exprime qu'une seule ART2, chez la souris, les deux isoformes ART2.1 et ART2.2 sont co-exprimées sur les cellules T. Cependant, comme l'ART2.1 n'est pas active dans des conditions non réductrices, il est probable que l'essentiel de l'activité enzymatique détectée la surface des lymphocytes T soit attribuable à l'ART2.2. L'expression des ART2 sur les lymphocytes a d'abord été étudiée chez le rat puis plus récemment chez la souris au moyen d'anticorps monoclonaux spécifiques (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1999). Chez les deux espèces, l'expression des ART2 est principalement restreinte aux cellules T matures et quiescentes CD4⁺ ou CD8⁺. Elle représente à ce titre un marqueur commode de cette sous-population. Dans le thymus de souris seules les cellules T matures CD3^{High}, exprimant de manière exclusive CD4 ou CD8, expriment l'ART2.2. En périphérie la majorité des cellules T exprime cette ecto-enzyme. Celles qui ne l'expriment pas, plus ou moins nombreuses selon la lignée murine étudiée, expriment des marqueurs tels que CD25 et pourraient correspondre à des cellules récemment activées *in vivo*. En effet, il a pu être montré *in vitro* que l'activation des cellules T induit un mécanisme actif de clivage de l'ART2.2 par des métallo-protéases qui libèrent ainsi ces enzymes dans le surnageant (Kahl, S. *et al.*, 2000; Nemoto, E. *et al.*, 1996a). Ce mécanisme rapide est très similaire à celui qui conduit à la perte de CD62L (L-sélectine) permettant aux lymphocytes T activés de migrer vers les sites inflammatoires. Toutefois, les CTL générés *ex-vivo* semblent exprimer de façon modulable une activité ADP-ribosyl transférase (Wang, J. *et al.*, 1994). Elle disparaît immédiatement après restimulation des cellules pour réapparaître ultérieurement après quelques jours de culture (Nemoto, E. *et al.*, 1996a). L'expression des ART serait ainsi la règle sur les lymphocytes T périphériques et son absence transitoire marquerait une activation récente.

3. Origine des purines naturelles

Bien que des travaux récents suggèrent que de l'ATP puisse être synthétisé dans le compartiment extracellulaire par des ecto-enzymes, l'essentiel des nucléotides extracellulaires résulte de leur libération des compartiments intracellulaires (Yegutkin, G.G. *et al.*, 2001; Yegutkin, G.G. *et al.*, 2002). La compréhension des mécanismes à l'origine de la libération des purines dans les fluides biologiques est essentielle à l'évaluation de l'importance de ce phénomène dans la communication cellulaire. Cette question est d'autant plus complexe que, dans les cellules à l'état normal, la majorité du NAD et une grande part de l'ATP sont localisés dans les mitochondries. Le relargage de quantités significatives de ces nucléotides nécessite donc une mobilisation de ces importantes réserves cellulaires. Trois principaux types de mécanismes peuvent conduire à un tel relargage: une exocytose de granules sécrétoires contenant des purines, un processus de sécrétion au travers de transporteurs membranaires et une libération du contenu intracellulaire par des cellules lésées ou des cellules mortes.

3.1 Libération des purines contenues dans des granules sécrétoires

La libération d'ATP dans l'espace extracellulaire a été rapportée dans différentes conditions physiologiques dont certaines sont aujourd'hui bien connues. En 1964, Burnstock et ses collaborateurs identifièrent la présence d'un neurotransmetteur particulier dans les fibres nerveuses « non adrénérgiques et non cholinérgiques » innervant le tractus intestinal (Burnstock, G. *et al.*, 1964). Ce neurotransmetteur se révéla être l'ATP et les fibres nerveuses sécrétant ce neurotransmetteur furent qualifiés de « purinérgiques » (Burnstock, G., 1972). Dans ces neurones, l'ATP est stocké dans les vésicules pré-synaptiques. Des neurones purinérgiques sont retrouvés dans le système nerveux sympathique innervant les muscles lisses de l'aorte, des veines mésentériques et pulmonaires, parmi les nerfs parasympathiques innervant la vessie, ou encore, comme il a été évoqué précédemment, parmi certaines fibres nerveuses « non adrénérgiques et non cholinérgiques » innervant le tractus intestinal

(Burnstock, G., 1988; Burnstock, G. *et al.*, 2000; Ralevic, V. *et al.*, 1998). Dans ces fibres nerveuses, l'ATP contenu dans les vésicules pré-synaptiques est co-sécrété avec d'autres neurotransmetteurs plus conventionnels tels que l'acétylcholine dans les fibres parasympathiques ou la noradrénaline dans les fibres sympathiques (Burnstock, G., 1976). Des observations indirectes suggèrent que l'ATP joue également le rôle de co-neurotransmetteurs dans certains territoires du système nerveux central (Ralevic, V. *et al.*, 1998). C'est le cas, par exemple, dans le *locus coeruleus* où la transmission synaptique peut être bloquée par la désensibilisation des récepteurs P2X ou l'utilisation de leurs antagonistes (Nieber, K. *et al.*, 1997).

En dehors des neurones, d'autres cellules sont capables de sécréter des vésicules contenant des purines. C'est le cas des cellules chromaffines de la glande surrénale ou des plaquettes sanguines (Cena, V. *et al.*, 1990; Gordon, J.L., 1986). Les granules denses des plaquettes contiennent en effet des concentrations d'ATP et d'ADP de l'ordre du milli-molaire (Gachet, C., 2001). La sécrétion de purines joue un rôle essentiel dans l'agrégation plaquettaire et dans le maintien de l'hémostase. Lorsque les plaquettes sont stimulées par la thrombine, les concentrations d'ATP et d'ADP atteignent localement des valeurs supérieures à 100 μ M (Gordon, E.L. *et al.*, 1986). Les plaquettes constituent donc une source physiologique importante d'ATP et d'ADP rapidement mobilisable dans des situations de lésions tissulaires.

3.2 Libération de purines au travers de transporteurs membranaires

Dans certains cas, un flux sortant de nucléotide a pu être observé au travers de transporteurs membranaires. L'ATP est ainsi libéré par les cellules épithéliales des muqueuses bronchiques, les cellules de l'endothélium vasculaire ou les cellules musculaires (squelettiques et cardiaques). La libération d'ATP par cette voie peut résulter d'une réponse cellulaire physiologique à une stimulation mécanique ou physique (Watt, W.C. *et al.*, 1998). Par exemple, les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur les cellules de

l'endothélium vasculaire stimulent la sécrétion d'ATP (Burnstock, G., 2001). Au niveau de l'épithélium bronchique, la libération d'ATP et d'UTP est vraisemblablement provoquée par les variations de l'osmolarité du milieu extracellulaire (Mitchell, C.H. *et al.*, 1998; Taylor, A.L. *et al.*, 1998). Les muscles squelettiques et le cœur, quant à eux, libèrent de l'ATP lorsqu'ils sont en hypoxie (Clemens, M.G. *et al.*, 1981; Forrester, T., 1972). Ce mécanisme participe au développement de l'hyperhémie réactionnelle qui permet de rétablir localement un flux sanguin suffisant pour répondre à la demande métabolique au cours du travail musculaire (Forrester, T. *et al.*, 1969; Oxhorn, B.C. *et al.*, 2000). Ainsi, la libération d'ATP joue un rôle physiologique important au niveau des muscles où sa libération durant l'exercice régule localement la tension vasculaire.

L'identité des transporteurs membranaires impliqués dans le transport de l'ATP des compartiments cellulaires vers l'extérieur n'est pas clairement établie (Watt, W.C. *et al.*, 1998). L'implication de protéines appartenant à la famille des transporteurs de type "*ATP binding cassette*" (ABC) a été proposée. C'est le cas par exemple de la protéine CFTR ("*cystic fibrosis transmembrane regulator*") ou de la glycoprotéine P (MDR-1) (Schwiebert, E.M. *et al.*, 1995). D'autres protéines semblent également pouvoir jouer ce rôle telles les hémiconnexines qui forment des canaux (Abraham, E.H. *et al.*, 1993). Récemment, la connexine 43 a été spécifiquement impliquée dans le transport du NAD cytoplasmique vers le milieu extracellulaire (Bruzzone, S. *et al.*, 2001). Ces mêmes auteurs suggèrent l'existence d'une boucle autocrine de stimulation dans laquelle le NAD accédant au compartiment externe au travers de cette connexine serait transformé par CD38 en ADP-ribose cyclique, lequel en retournant dans le cytoplasme stimulerait la libération des stocks calciques.

3.3 Libération de purines par les cellules lésées

Etant donnée l'importance des concentrations intracellulaires des nucléotides puriques, ATP ou NAD, il paraît évident qu'une des sources majeures de nucléotides extracellulaires est

leur libération passive lors de la mort cellulaire. La concentration intracellulaire d'ATP est par exemple comprise entre 3 et 5 mM. Il a été montré que dans des conditions standardisées d'incision cutanée, la concentration d'ATP atteint localement des valeurs comprises entre 2 et 20 μ M (Born, G.V. *et al.*, 1984; Ryan, L.M. *et al.*, 1996). Ces observations autorisent à penser que des quantités élevées de purines puissent être libérées dans les sites inflammatoires. Bien que cette hypothèse soit fréquemment avancée dans la littérature, très peu de données l'étayent aujourd'hui. Cependant, une étude récente montre par exemple que l'infection de la lignée de macrophages J774 par *Mycobacterium tuberculosis* provoque une libération d'ATP dans le milieu de culture (Sikora, A. *et al.*, 1999). Les auteurs suspectent que son apparition dans le milieu soit en relation avec la toxicité du parasite et la libération consécutive du contenu des cellules lésées. *In vivo*, les nucléotides libérés dans le site inflammatoire pourraient participer au recrutement puis à l'activation des cellules dendritiques (Idzko, M. *et al.*, 2002; la Sala, A. *et al.*, 2002). Globalement, ces observations soutiennent l'idée que des purines puissent être libérées dans le site inflammatoire mais une démonstration formelle reste encore à apporter.

4. Intervention des purines extracellulaires dans la régulation des fonctions immunes

Les cellules du système immunitaire expriment de nombreux récepteurs sensibles aux purines extracellulaires ainsi que des enzymes capables de les hydrolyser ou de les utiliser pour modifier de manière post-traductionnelle les protéines membranaires. L'existence de ces diverses protéines ouvre le champ nouveau d'un rôle immuno-modulateur des purines extracellulaires. Cependant, l'étude du rôle des purines *in vivo* est complexe, à cause des nombreuses enzymes qui les dégradent rapidement. De plus, la plupart des purines ne sont pas reconnues par un seul récepteur mais, bien souvent, par plusieurs d'entre eux. C'est le cas par exemple de l'ATP qui peut aussi bien activer les récepteurs de type P2X que de type P2Y (Tableau 3 et 5, pages 22 et 25). La figure 8 illustre la complexité de cette situation qui rend difficile les études dynamiques *in vivo* (page 52). Ainsi, au travers des enzymes

membranaires, un nucléotide libéré par une cellule, en principe ligand des récepteurs P2, peut devenir un nucléoside ligand des récepteurs P1. Enfin, l'étude du rôle des purines extracellulaires est aussi compliquée par des phénomènes de désensibilisation rapide des récepteurs lorsqu'ils sont stimulés de manière chronique par leur ligand (Tableau 4 page 24 et (Ralevic, V. *et al.*, 1998)). Aussi, la réponse biologique dépend tout autant de la disponibilité du ligand que du degré de désensibilisation du récepteur qui est, le plus souvent, difficile à estimer *in vivo*. Un des exemples illustrant cette notion vient de l'étude de souris dont le gène codant pour CD39 (NTPDase1) a été invalidé par recombinaison homologue. Chez ces souris, les plaquettes ne répondent plus à l'agrégation induite par l'ADP (Enjyoji, K. *et al.*, 1999). Ce résultat est surprenant à première vue car CD39 hydrolyse l'ADP et inhibe ainsi son action. Les souris CD39^{-/-} étant dépourvues d'activité ADPase dans la circulation sanguine, on devait donc plutôt s'attendre à ce qu'elles soient sujettes à des thromboses dues à une agrégation spontanée des plaquettes induite par l'ADP circulant. L'absence de réponse plaquettaire chez ces animaux résulte en fait d'une désensibilisation des récepteurs P2Y₁ impliqués dans la réponse à l'ADP. Ceci est démontré par la restauration *in vitro* de la réponse à l'ADP par un pré-traitement des plaquettes avec une apyrase exogène ayant une activité similaire à celle de CD39. Les auteurs de ce travail ont conclu que l'activité ADPase de CD39 permet dans ce modèle de prévenir la désensibilisation des récepteurs P2Y à l'ADP soumis *in vivo* à des concentrations faibles mais relativement constantes de purines plasmatiques.

En dépit de ces difficultés, il existe de nombreuses observations expérimentales montrant une action des purines sur les fonctions immunes. Quelles que soient les précautions qu'il convient de prendre quant à leur signification biologique, ces observations suggèrent, de manière évidente que l'Ado, l'ATP et le NAD ont des actions différentes.

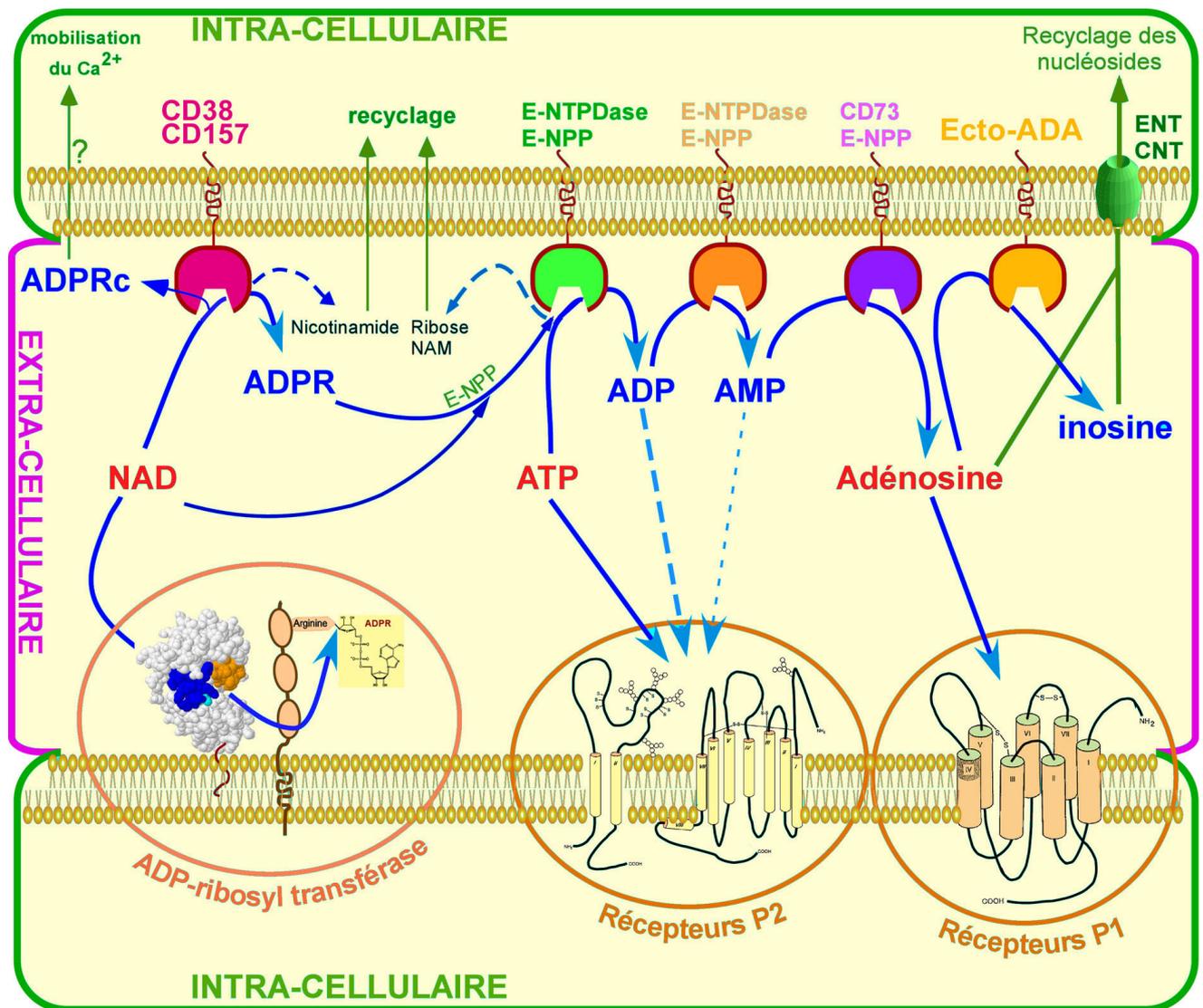


Figure 8: Représentation schématique du rôle et du devenir des principales purines extracellulaires. Les enzymes et les récepteurs aux purines sont ici représentés sur deux cellules distinctes mais peuvent en réalité se trouver sur la même cellule. L'hydrolyse du NAD et de l'ADPR par les E-NPP conduirait plutôt à la formation d'AMP et de NAM (nicotinamide adénine mononucléotide) plutôt qu'à la formation d'ADP et de ribose, bien que cette possibilité ne puissent pas être complètement écartée.

4.1 Adénosine et immunité

Dès 1983, l'adénosine a été montrée avoir des effets inhibiteurs *in vitro* sur la production de peroxydes et la dégranulation des neutrophiles activés (Cronstein, B.N. *et al.*, 1983). Des études complémentaires permirent de proposer l'implication des récepteurs A₂ dans ces effets de l'adénosine (Cronstein, B.N. *et al.*, 1985). Dans d'autres études l'adénosine fut montrée inhibitrice des fonctions des monocytes et en particulier de leur capacité à générer une cytokine aux puissants effets pro-inflammatoires, le TNF- α . Ces effets majeurs se traduisent *in vivo* par la résistance au choc septique fatal induit par les endotoxines chez des souris prétraitées par l'adénosine ou certains de ses analogues (Parmely, M.J. *et al.*, 1993). L'inflammation est la base de nombreuses pathologies chez l'Homme. Aussi, la découverte des effets anti-inflammatoires de l'adénosine pourrait être à l'origine de nouvelles stratégies thérapeutiques. Certaines drogues utilisées dans le traitement des pathologies inflammatoires semblent indirectement liées à la libération d'adénosine (Cronstein, B.N., 1995). Ainsi, diverses données expérimentales aussi bien *in vitro* que *in vivo* indiquent que le methotrexate, une drogue administrée à faibles doses aux patients souffrant d'arthrites rhumatoïdes, conduit à une libération accrue d'adénosine dans les sites inflammatoires (Cronstein, B.N. *et al.*, 1993). De même, l'injection d'ADA (adénosine déaminase) dans le site inflammatoire *in vivo* inhibe les effets protecteurs du methotrexate en transformant l'adénosine en inosine (Asako, H. *et al.*, 1993). Enfin, l'injection d'un inhibiteur de la 5'-nucléotidase qui transforme l'AMP en Ado, inhibe également l'effet anti-inflammatoire du methotrexate suggérant que, dans la poche inflammatoire, l'adénosine provient de la dégradation des nucléotides adényliques (Morabito, L. *et al.*, 1998).

Plus récemment, le récepteur à l'adénosine impliqué dans l'inhibition de la réponse inflammatoire a pu être identifié. Il s'agit du récepteur A_{2A}. Les souris dont le gène codant pour ce récepteur a été invalidé sont incapables de contrôler l'amplitude de la réponse inflammatoire dans différents modèles expérimentaux (Ohta, A. *et al.*, 2001). En absence de ce récepteur, les dommages causés par l'inflammation sont plus importants que chez les souris normales A_{2A}^{+/+} et peuvent aller jusqu'à la mort des animaux. Les auteurs proposent que

l'adénosine libérée dans le site inflammatoire participe *in vivo* au contrôle physiologique de la réaction inflammatoire aiguë au travers du récepteur A_{2A} . Enfin, très récemment, il a été montré grâce aux souris $A_{2A}^{-/-}$, que l'adénosine libérée dans le site inflammatoire participe aussi à la cicatrisation et induit localement une angiogenèse nécessaire à la revascularisation du tissu lésé (Montesinos, M.C. *et al.*, 2002). Ces exemples illustrent l'un des rares cas où la fonction biologique d'une purine extracellulaire a pu être clairement définie.

4.2 ATP et fonctions immunes

L'intervention de l'ATP extracellulaire dans la régulation de fonctions immunes est évidente quoique incomplètement appréhendée. Outre le fait que la présence d'ATP dans l'environnement où siège la réponse immune ne soit pas encore clairement établie, l'identification exhaustive des récepteurs à la surface des différentes catégories de cellules immunes reste encore à parachever. Cependant, certains récepteurs P2Y et P2X sont exprimés par la plupart de ces cellules (Tableau 8, page 55). A l'heure actuelle, seul le rôle de P2X₇, commun à toutes ces cellules a suscité un intérêt particulier.

Type cellulaire	P2Y	P2X
Lymphocytes T (Homme)		P2X ₁ ; P2X ₄ ; P2X ₇
Lymphocytes T (souris)		P2X ₇
Thymocytes (souris)	P2Y ₁ ; P2Y ₂	P2X ₁
Lymphocytes B (Homme)	P2Y	P2X ₇
Monocytes (Homme)	P2Y ₁ ; P2Y ₂ ; P2Y ₄ ; P2Y ₆	P2X ₇
Macrophages (Homme)	P2Y	P2X ₇
Cellules dendritiques (Homme)	P2Y ₁ ; P2Y ₂ ; P2Y ₄ ; P2Y ₆ ; P2Y ₁₁	P2X ₁ ; P2X ₄ ; P2X ₅ ; P2X ₇
Cellules de Langerhans (Homme)	P2Y	P2X ₇ (C.F.)
Cellules dendritiques (souris)	P2Y	P2X ₇
Macrophages péritonéaux (rat, souris)	P2Y	P2X ₇
Neutrophiles (Homme)	P2Y ₄ ; P2Y ₆	P2X ₇
Plaquettes (Homme)	P2Y ₁ ; P2Y ₁₂	P2X ₁
Erythrocytes (Homme)	P2Y ₁	P2X ₇ (C.F.)
Précurseurs hématopoïétiques (souris)		P2X ₇ (C.F.)
Lymphome YAC		P2X ₇ (C.F.)
Lignée de macrophages BAC1.2F5	P2Y	P2X ₇ (C.F.)
Lignée de macrophages RAW 264.7	P2Y	P2X ₇ (C.F.)
Lignée de macrophages J774	P2Y	P2X ₇
Lignée de macrophages THP-1	P2Y ₂	P2X ₇
Lignée de myéloblastes KG-1	P2Y ₁	
Lignée myéloïde HL-60	P2Y ₂ ; P2Y ₁₁	P2X ₁
Lignée de monocytes U937	P2Y ₂ ; P2Y ₆	
Mastocytome P-815		P2X ₇ (C.F.)

Tableau 8: Expression des récepteurs P2 dans les cellules sanguines. La caractérisation de l'expression de ces récepteurs est basée sur la détection des ARN messagers correspondant, la réactivité aux anticorps spécifiques ou sur des données pharmacologiques. Pour les récepteurs P2Y, l'identité précise du sous-type exprimé n'a parfois pas été caractérisée bien que les données fonctionnelles supposent l'expression de ce type de récepteur (noté « P2Y » dans le tableau). Pour le récepteur P2X₇, l'abréviation « C.F. » (pour Caractérisation Fonctionnelle) utilisée dans le tableau indique que, dans ce cas, le récepteur a été caractérisé sur la base de données fonctionnelles uniquement. D'après Di Virgilio F. *et al.* (Di Virgilio, F. *et al.*, 2001).

Les études *in vitro* ont montré que le récepteur P2X₇ est au carrefour de plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'activation comme dans la mort cellulaire. Comme activateur, la stimulation de P2X₇ par l'ATP semble promouvoir la prolifération des lymphocytes T et B, permettre la libération de cytokines comme l'IL1-β, induire la migration des cellules dendritiques immatures, voire provoquer la maturation des précurseurs des cellules dendritiques (Di Virgilio, F. *et al.*, 2001; Idzko, M. *et al.*, 2002; la Sala, A. *et al.*, 2002). Comme récepteur cytolytique capable d'induire la mort des lymphocytes T et B et des macrophages, le récepteur P2X₇ activé par l'ATP interviendrait dans l'élimination des macrophages infectés par des pathogènes intracellulaires ou les fonctions cytotoxiques des CTL et des cellules NK (Filippini, A. *et al.*, 1990) (Di Virgilio, F., 1995; Di Virgilio, F. *et al.*, 1998; Di Virgilio, F. *et al.*, 1990; Mancino, G. *et al.*, 2001).

Ainsi, l'incubation *in vitro* de macrophages murins et humains avec de fortes concentrations d'ATP (1-5 mM) induit leur mort en activant le récepteur P2X₇ (Di Virgilio, F. *et al.*, 2001). Ce phénomène est remarquable car, dans le cas de macrophages infectés par des mycobactéries, il conduit aussi à la mort des parasites contrairement à ce qui est observé avec d'autres facteurs cytotoxiques comme les peroxydes (Lammas, D.A. *et al.*, 1997). De récentes données confirment le rôle essentiel du récepteur P2X₇ dans ce mécanisme en s'appuyant sur des souris P2X₇^{-/-}, déficientes pour l'expression de ce récepteur (Fairbairn, I.P. *et al.*, 2001). Les mycobactéries sont capables de survivre à l'intérieur des macrophages en utilisant différentes stratégies telles que le blocage de la production de radicaux libres normalement induite par la phagocytose et l'inhibition active de la fusion des phagosomes et des lysosomes (Clemens, D.L. *et al.*, 1995; Manca, C. *et al.*, 1999). La stimulation du récepteur P2X₇ semble capable de restaurer cette fusion. Les événements moléculaires impliqués dans ce processus requièrent la génération d'un influx calcique et la stimulation de la phospholipase D (Fairbairn, I.P. *et al.*, 2001; Kusner, D.J. *et al.*, 2001). L'activation de P2X₇ par l'ATP extracellulaire pourrait ainsi participer à la lutte contre les mycobactéries et, de manière plus générale, contre les pathogènes intracellulaires. Ce rôle semble tout au moins se vérifié dans le cas de l'infection par Chlamydia. En effet, dans cet autre modèle d'infection des macrophages par des parasites intracellulaires, l'activation de P2X₇ affecte le pouvoir infectieux et la survie du pathogène (Coutinho-Silva, R. *et al.*, 2001). Par ailleurs, en utilisant

les souris P2X₇^{-/-} d'autres auteurs ont montré qu'il existe un mécanisme de lutte contre les infections à pathogènes intracellulaires impliquant l'ATP mais indépendant du récepteur P2X₇. Ce processus met toutefois en cause un récepteur de type P2 dont l'activation stimule fortement la production des radicaux libres, directement responsables de la toxicité exercée sur les mycobactéries (Sikora, A. *et al.*, 1999). Ces observations suggèrent globalement que l'ATP joue un rôle important dans la lutte contre les mycobactéries et les bactéries intracellulaires. Toutefois, l'importance physiologique *in vivo* de ces mécanismes reste encore à préciser. Sachant qu'il existe chez l'Homme une mutation E496A du récepteur P2X₇ qui affecte profondément sa fonctionnalité (Gu, B.J. *et al.*, 2001) et une mutation I568B qui inhibe l'expression du récepteur à la membrane (Wiley, J.S. *et al.*, 2003), des études épidémiologiques sur la fréquence de ces mutations chez les patients tuberculeux permettront sans doute de mieux appréhender le rôle de P2X₇ *in vivo*. Une première étude épidémiologique qui vient de paraître semble conforter l'importance de ce récepteur dans la résistance contre la tuberculose (Li, C.M. *et al.*, 2002).

Le récepteur P2X₇ joue parallèlement un rôle important dans la maturation et la sécrétion de l'IL1-β. Cette cytokine pro-inflammatoire majeure est produite en abondance par les monocytes et les macrophages activés. L'IL1-β est d'abord synthétisée sous sa forme immature (pro-IL1-β) et ne deviendra active qu'après avoir été clivée par la caspase-1. Au final, la libération de l'IL1-β nécessite un premier signal tel que le LPS qui induit la transcription du gène codant pour la pro-IL1-β et un second signal permettant d'activer la caspase-1. Le mécanisme qui aboutit à la stimulation de la caspase-1 n'est pas connu avec précision mais semble lié à une diminution de la concentration cytoplasmique des ions potassiums (Cheneval, D. *et al.*, 1998). Par ailleurs, la sécrétion d'IL1-β ne suit pas les voies classiques de sécrétion des protéines et semble réalisée par l'intermédiaire de microvésicules, formées par des bourgeonnements de la membrane plasmique (MacKenzie, A. *et al.*, 2001). L'incubation de macrophages pré-stimulés par le LPS avec de l'ATP conduit à la sécrétion d'importantes quantités d'IL1-β. La maturation comme la libération d'IL1-β dans le milieu extérieur semblent dépendre du récepteur P2X₇. En effet, les macrophages issus de souris P2X₇^{-/-} sont incapables de produire la forme mature de l'IL1-β suite à l'action synergique du

LPS et de l'ATP (Solle, M. *et al.*, 2001). De même, la formation des micro-vésicules, semble induite par la stimulation prolongée du récepteur P2X₇ (MacKenzie, A. *et al.*, 2001). L'ATP au travers de ce récepteur participe donc à la fois à la maturation de l'IL1-β et à son exportation vers l'espace extracellulaire. *In vivo*, l'injection de LPS et d'ATP dans la cavité péritonéale de souris normales induit la synthèse d'IL1-β et stimule fortement la production d'IL-6 illustrant le potentiel pro-inflammatoire des mécanismes liés à la stimulation de P2X₇ dans l'environnement physiologique. Chez les souris P2X₇^{-/-}, ce traitement n'induit qu'une faible production d'IL-6 (également induite par le LPS seul) et ne promeut pas la production de l'IL1-β (Solle, M. *et al.*, 2001). Toutefois, le recours à l'injection d'ATP exogène dans ce modèle ne permet pas d'estimer la pertinence physiologique de ces observations. Dans un autre modèle, l'injection d'un anticorps monoclonal spécifique du collagène suivie de l'administration de LPS produit des lésions inflammatoires des articulations. Les souris déficientes dans l'expression du récepteur P2X₇ sont significativement moins affectées par ce traitement (Labasi, J.M. *et al.*, 2002). Ce modèle plus proche de la physiologie semble confirmer que l'activation du récepteur P2X₇ par l'ATP libéré dans l'environnement *in situ* pourrait participer à l'amplification de la réponse inflammatoire en stimulant localement la production de cytokines.

L'ATP semble par ailleurs pouvoir être libéré par les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T CD4⁺ activés et les cellules NK (Filippini, A. *et al.*, 1990; Henney, C.S., 1973; Mizumoto, N. *et al.*, 2002). Un rôle assez inattendu lié à sa libération a été suggéré. L'ATP libéré par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK, participerait au mécanisme de cytotoxicité en stimulant le récepteur pro-apoptotique P2X₇ sur les cellules cibles (Di Virgilio, F. *et al.*, 1990; Filippini, A. *et al.*, 1990). D'après les auteurs de ces études, l'ATP pourrait ainsi compléter l'arsenal des molécules responsables de la cytolyse. Les cellules cytotoxiques exprimant elles-mêmes un récepteur P2X₇ se protégeraient de l'effet délétère de l'ATP par la surexpression d'ecto-ATPases à leur surface. Des données récentes attribuent à l'ATP libéré par les lymphocytes T activés un rôle supplémentaire. Il interviendrait dans l'activation des cellules de Langerhans au travers de récepteurs P2 (Mizumoto, N. *et al.*, 2002). L'ATP, libéré par les cellules T, serait ainsi utilisé aussi bien dans l'exécution des fonctions effectrices que dans la coopération entre les différents partenaires de l'immunité.

4.3 Le NAD dans l'immunité innée et acquise

Comme nous l'avons indiqué, le NAD, probablement libéré dans des conditions proches de celles conduisant à la libération d'ATP, peut intervenir sur l'immunité par l'intermédiaire de deux familles d'enzymes, les NADases et ADPR-cyclases comme CD38 ou CD157 et les ecto-ADP-ribosyl transférases (ART).

4.3.1 les fonctions de CD38 dans la régulation de l'immunité

Le rôle de CD38 dans le système immunitaire reste encore aujourd'hui confus. CD38 est en effet présent à la surface des lymphocytes T, B, des macrophages et des neutrophiles à différents moments de leur différenciation ou de leur maturation. A cet égard, il pourrait être considéré comme un simple marqueur de différenciation comme cela est souvent le cas dans les publications. Cependant, CD38 est une enzyme capable d'hydrolyser le NAD extracellulaire pour donner de l'ADPR et de la nicotinamide. Dans cette vision, CD38 participerait à une sorte de « salvage pathway », en particulier de la nicotinamide, qui, il convient de le rappeler, est la vitamine B3. Cependant, trois types d'observations indiquent que CD38 est impliqué dans des événements de signalisation. Les premières découlent de l'influence des anticorps anti-CD38 sur différents types cellulaires. Viennent ensuite des observations suggérant son interaction apparente avec CD31. Enfin, CD38 a la capacité de générer de l'ADP-ribose cyclique qui semble représenter une nouvelle classe de seconds messagers.

Plusieurs anticorps monoclonaux anti-CD38 apparaissent agir comme des agonistes capables de transduire des signaux. Leur utilisation sur des lignées cellulaires T exprimant CD38 ont montré des effets mesurables sur la prolifération, l'activation et la production de cytokine (Ausiello, C.M. *et al.*, 1996; Funaro, A. *et al.*, 1990). L'analyse des événements précoces déclenchés par l'utilisation de ces anticorps indique que la transduction du signal passe par une réponse calcique et par la phosphorylation de protéines également mobilisées lors de la stimulation du complexe TCR/CD3 (ZAP-70, CD3 ζ et PLC- γ) (Morra, M. *et al.*,

1998; Zubiaur, M. *et al.*, 1999). D'ailleurs, l'intégrité de la machinerie de signalisation passant par ce complexe TCR/CD3 semble nécessaire à l'activation de la voie initiée par CD38. En effet, en l'absence des protéines p56^{lck} ou TCR-β nécessaires au fonctionnement du complexe TCR/CD3, les lignées cellulaires ne répondent plus à la signalisation passant par les anticorps anti-CD38 (Morra, M. *et al.*, 1998). Ces résultats ont conduit à proposer que CD38 soit capable, dans certaines conditions, d'utiliser les voies de transduction de signaux associées aux sous-unités du récepteur des cellules T. D'autres auteurs ont été amenés aux mêmes conclusions dans des lignées de cellules B. En effet, dans les cellules A20 transfectées par CD38, la signalisation initiée par des anticorps anti-CD38 semble lié au fonctionnement du récepteur des cellules B (BCR). Les clones cellulaires ayant perdus la capacité de répondre au travers du BCR sont également incapables de répondre à une stimulation par des anti-CD38 (Lund, F.E. *et al.*, 1996). Dans ce modèle facilement manipulable, les auteurs se sont attachés à exclure l'implication fonctionnelle de la partie cytoplasmique de CD38 au moyen de constructions génétiques dans lesquelles la partie cytoplasmique ou transmembranaire de CD38 ont été tronquée ou remplacée. La transfection de ces constructions dans les cellules A20 montre que les protéines CD38 ainsi modifiées conservent leur fonction de signalisation (Lund, F.E. *et al.*, 1998; Lund, F.E. *et al.*, 1996). Avec une approche similaire, les auteurs ont montré par la suite que les modifications ponctuelles de la séquence primaire, de nature à affecter l'activité enzymatique de CD38, n'affectent que partiellement la signalisation initiée par les anticorps anti-CD38. Les fonctions de signalisation de CD38 paraissent donc, dans ce modèle, indépendantes de l'activité enzymatique (Lund, F.E. *et al.*, 1999).

CD38 semble se comporter comme une protéine bi-fonctionnelle qui, en plus de son activité enzymatique, est capable d'interagir avec CD31. CD31 est une protéine d'adhésion exprimée par les cellules endothéliales, les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes. Cette protéine d'adhésion semble avoir une affinité faible pour la molécule CD38. En effet, une interaction entre CD38 et CD31 a pu être mise en évidence au niveau biochimique entre protéine recombinante ainsi que dans des systèmes cellulaires (Deaglio, S. *et al.*, 1998; Horenstein, A.L. *et al.*, 1998). La liaison de CD38 à ce ligand semble reproduire en partie les résultats obtenus auparavant avec les anticorps anti-CD38. Ainsi, le contact cellulaire entre des cellules qui expriment fortement CD31 à leur surface et des lymphocytes

T CD38⁺ conduit chez ces derniers à l'internalisation de CD38, à l'élévation de la concentration du Ca⁺⁺ dans le cytoplasme et à la synthèse de cytokines (Deaglio, S. *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-CD38 puissent mimer l'interaction naturelle entre CD38 et CD31 et confirment partiellement l'hypothèse selon laquelle CD38 pourrait se comporter comme un récepteur. Cependant, CD31 est également connu pour interagir fortement avec elle-même (adhésion homomérique) mais aussi avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ présente à la surface des cellules endothéliales et plus modestement avec des résidus aminoglycans de la matrice extracellulaire (DeLisser, H.M. *et al.*, 1994; Newman, P.J., 1997). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est une protéine multi-modulaire composée de 6 domaines extracellulaires de type immunoglobuline, chacun impliqués dans des fonctions différentes. Ainsi, le domaine 1, le plus éloigné de la partie membranaire, est essentiel à l'interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ alors que le domaine 2 serait impliqué aussi bien dans l'interaction avec les résidus aminoglycans qu'avec CD38 (Deaglio, S. *et al.*, 2000). L'existence de multiples partenaires pour CD31 ne laisse que difficilement présager l'importance de l'interaction entre CD31 et CD38 dans l'activation et le recrutement des lymphocytes *in vivo*.

Parallèlement, l'activité enzymatique de CD38 suscite un regain d'intérêt depuis la caractérisation des effets biologiques de l'ADP-ribose cyclique. Ce métabolite du NAD, produit en faible proportion par CD38, est considéré comme un second messager intracellulaire impliqué dans la libération des stocks calciques cellulaires sensibles à la ryanodine (Guse, A.H., 2002). A cet égard, il a été proposé une autre implication de CD38 dans la signalisation cellulaire dépendant de son activité enzymatique et résultant de la production d'ADPRc. L'équipe de De Flora a montré que l'introduction du gène codant pour CD38 dans une lignée de fibroblastes induit une élévation spontanée et durable de la concentration calcique cytoplasmique et stimule la prolifération (Zocchi, E. *et al.*, 1998). Ces observations soulèvent cependant un problème qualifié de « topologique » (De Flora, A. *et al.*, 1997). CD38 est en effet une ecto-enzyme localisée dans le compartiment extracellulaire où le NAD est présent en très faible quantité. De plus, l'ADP-ribose cyclique qui y serait produit devrait pour être actif pénétrer à l'intérieur de la cellule. Plusieurs efforts ont été consacrés à la résolution de ce paradoxe topologique apparent. L'équipe de De Flora propose aujourd'hui un modèle dans lequel le NAD intracellulaire pourrait accéder au compartiment

extracellulaire au travers de canaux trans-membranaires tels que ceux formés par la connexine 43 (Bruzzone, S. *et al.*, 2001). L'ADP-ribose cyclique formé par CD38 en présence de NAD dans le compartiment extracellulaire pourrait alors retourner dans le cytoplasme selon deux voies. La première prend en considération le fait que CD38 est présent à la membrane sous forme de dimères ou de multimères. Des expériences réalisées avec des membranes reconstituées suggèrent que dans les multimères, la production d'ADP-ribose cyclique soit couplée à sa translocation vers le compartiment interne (Franco, L. *et al.*, 1998). CD38 agirait donc lui-même comme un transporteur actif de l'ADP-ribose cyclique néoformé. Plus récemment, les mêmes auteurs ont proposé une seconde voie complémentaire ou indépendante selon laquelle l'ADP-ribose cyclique serait transporté vers le cytoplasme par les transporteurs équilibratifs et concentratifs de nucléosides normalement présents à la surface des cellules (Guida, L. *et al.*, 2002). Cependant, l'interprétation de ces données est remise en question par une autre équipe. En utilisant différents types de constructions génétiques, Sun a montré que la réponse calcique générée par le NAD extracellulaire dans des cellules 3T3 transfectées peut être observée en l'absence de CD38 à la surface membranaire à condition que l'enzyme soit présente à l'intérieure de la cellule (Sun, L. *et al.*, 2002). Ces auteurs montrent d'ailleurs que CD38 est normalement présent à la surface mais aussi à l'intérieur des cellules. En microscopie confocale il peut être co-localisé en association étroite avec le récepteur à la ryanodine au niveau du réticulum endoplasmique où l'ADP-ribose cyclique est supposé agir (Adebanjo, O.A. *et al.*, 1999; Sun, L. *et al.*, 2002). Ces observations surprenantes posent un autre problème topologique. Comment le NAD rajouté dans le compartiment extracellulaire peut-il atteindre CD38 localisé à l'intérieur de la cellule ? Sun et al. proposent l'existence de transporteurs du NAD sans en apporter la preuve. Cette question est cependant soulevée par d'autres observations. Ainsi, l'incubation pendant 5 minutes de cellules HeLa ou 3T3 en présence de NAD, de NADH, de NADP ou de NADPH conduit à l'augmentation rapide de la concentration intracellulaire du dinucléotide rajouté dans le milieu (Zocchi, E. *et al.*, 1999). Dans cette étude, le transporteur en cause semble présenter une certaine sensibilité à la conformation et la structure de la nicotinamide comme l'atteste son incapacité à importer efficacement l' α -NAD et le FAD. L'identité de ce transporteur reste cependant inconnue. Dans un tout autre domaine, celui de la pharmacologie, des analogues du NAD ont été développés comme inhibiteurs des inosine monophosphate déhydrogénases

(Pankiewicz, K.W., 1997). Ces molécules ont de puissants effets anticancéreux sur les modèles cellulaires *in vitro*. La manière dont ces molécules peuvent pénétrer reste, elle aussi, mystérieuse.

Une des approches pour mieux comprendre le rôle de CD38 dans le système immunitaire est la construction de souris dont le gène codant pour CD38 a été invalidé. Les souris CD38^{-/-} ont un développement normal y compris pour le système immunitaire. Cependant, ces animaux ont une réponse humorale aux antigènes T-dépendants significativement moins importante comparée aux animaux témoins dans les conditions où la quantité d'antigène injectée reste limitante (Cockayne, D.A. *et al.*, 1998). De façon plus marquée, les souris CD38^{-/-} semblent incapables de développer une réponse anticorps secondaire de type IgG1. Cette observation suggère que CD38 participe à la mise en place ou au maintien de la mémoire immunologique (Cockayne, D.A. *et al.*, 1998). Les souris CD38^{-/-} sont également nettement plus sensibles aux infections bactériennes que leurs homologues normaux (Partida-Sanchez, S. *et al.*, 2001). La raison principale de ce déficit fonctionnel semble liée à une incapacité à recruter les neutrophiles au site inflammatoire. L'étude des mécanismes sous-jacents indique que les neutrophiles prélevés sur les souris déficientes en CD38 répondent moins bien à certains signaux chimiotactiques tel que le fMLP en raison d'une incapacité apparente à réaliser une réponse calcique normale à ce stimulus. L'utilisation du 8-Br-ADPRc, qui se fixe comme antagoniste sur le récepteur à la ryanodine, suggère que la production d'ADP-ribose cyclique par CD38 régule la réponse calcique nécessaire à la réponse chimiotactique des neutrophiles (Partida-Sanchez, S. *et al.*, 2001). La généralité de cette conclusion doit cependant être nuancée par le fait que l'absence de CD38 ne semble pas affecter la réponse des neutrophiles à d'autres molécules chimiotactiques telle que l'IL8.

CD38 apparaît donc comme une protéine bi-fonctionnelle qui se comporte à la fois comme un récepteur dont le ligand pourrait être CD31 et comme une enzyme capable de générer en faible quantité de l'ADP-ribose cyclique, un second messager capable de mobiliser

les stocks calciques intracellulaires. CD38 peut aussi être considérée comme une enzyme capable de dégrader le NAD facilitant ainsi le recyclage de la nicotinamide et des dérivés de l'adénine dont la synthèse est coûteuse (Deterre, P. *et al.*, 1996).

4.3.2 Fonctions physiologiques des mono-ADP-ribosyl transférases (ART)

Les premières données expérimentales témoignant de l'importance de ces enzymes dans le système immunitaire ont d'abord été accumulées chez le rat dans un modèle de diabète insulino-dépendant (DID) spontané. Les rats de la lignée « diabétique prédisposé » (DP)-BB développent spontanément un DID après 120 jours avec une incidence de l'ordre de 80%. En revanche, il existe une lignée dérivée « diabétique résistante » (DR)-BB, de CMH identique, dont moins de 1% des représentants développe spontanément un DID. La comparaison du système immunitaire de ces deux lignées a montré une lymphopénie chez la lignée DP-BB caractérisée par l'absence d'une sous population de cellules T exprimant l'ADP-ribosyl transférase ART2, alors que 70% des lymphocytes T post-thymiques expriment l'ART2 chez la souche résistante DR-BB (Angelillo, M. *et al.*, 1988; Haag, F. *et al.*, 1993). Des expériences complémentaires ont par la suite confirmé l'importance de la sous-population T exprimant l'ART2 dans le contrôle du développement du diabète. Ainsi, le transfert de cellules T ART2⁺ provenant de la souche DR-BB protège les receveurs DP-BB de la survenue d'un DID (Fowell, D. *et al.*, 1993). Réciproquement, les animaux DR-BB traités pendant la période néonatale par des anticorps cytotoxiques anti-ART2 développent un DID avec une incidence moyenne de l'ordre de 50% (Greiner, D.L. *et al.*, 1987). Ces données suggèrent donc que la sous population T définie par l'expression membranaire de l'ART2 joue un rôle déterminant dans le contrôle précoce du développement de la maladie. D'autres données expérimentales chez la souris confortent l'hypothèse que les ART pourraient être activement impliquées dans les maladies autoimmunes. La souris NOD est considérée comme un second modèle d'étude du diabète autoimmun insulino-dépendant de type I. Ce modèle diffère du précédent à bien des égards. Au niveau du système immunitaire, l'une des différences notables

est que contrairement aux rats DP-BB, lymphopéniques, les souris NOD présentent un syndrome lymphoprolifératif (Yoshida, K. *et al.*, 2000). Mais, fait tout aussi remarquable, les souris NOD sont également déficientes dans l'expression des ART2 (Ablamunits, V. *et al.*, 2001; Prochazka, M. *et al.*, 1991). Dans ces deux modèles l'absence apparente des ART2 à la surface des cellules T semble constituer un facteur de prédisposition au développement du DID. Cette conclusion semble vérifiée dans d'autres modèles de maladies autoimmunes. Les souris (NZWxNZB)F1 représentent, par exemple, un modèle murin du lupus érythémateux. Chez ces souris, le niveau d'expression des ART2 lymphocytaires est également, anormalement bas (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1995). Le défaut d'expression des ART ne constitue pourtant pas le seul facteur génétique de prédisposition au lupus comme en témoigne le parent NZW. Ces souris expriment peu l'ART2.1 et présentent une délétion du gène de l'ART2.2 mais ne développent pas une maladie autoimmune aussi sévère que les hybrides (NZWxNZB)F1 (Theofilopoulos, A.N. *et al.*, 1989). Ainsi, dans ce modèle, il a été proposé que le défaut d'expression des ART2, transmis par le parent NZW, amplifie la prédisposition génétique aux maladies autoimmunes du parent NZB qui produit spontanément divers anticorps autoréactifs. En d'autres termes, l'expression des ART sur les lymphocytes T pourrait participer au maintien de la tolérance périphérique et à la prévention des manifestations auto-immunes.

L'existence de relations entre des anomalies de l'expression des ART et les maladies autoimmunes ne permet pas d'apprécier le rôle de ces enzymes ni leur fonction biologique. Dans ces différents modèles les ART n'ont été utilisées que comme des marqueurs d'une sous population lymphocytaire. Les premières données relatives à la régulation de l'immunité par une activité ADP-ribosyl transférase ont été rapportées par le groupe de Dennert (Okamoto, S. *et al.*, 1998). Cette équipe a d'abord montré qu'il était possible d'inhiber la prolifération et l'activité cytotoxique de CTL générées *in vitro* en les pré-incubant avec de faibles concentrations de NAD. Cette inhibition sélective par le NAD semblait dépendre de la présence d'une activité ADP-ribosyl transférase ancrée à la membrane des CTL par l'intermédiaire d'un groupement glypié (Wang, J. *et al.*, 1994). Ces mêmes auteurs ont par la suite montré qu'en présence de NAD de nombreuses protéines membranaires sont ADP-

ribosylées (Okamoto, S. *et al.*, 1998). Six protéines cibles ont été caractérisées: LFA-1, CD8, CD27, CD43, CD44 et CD45 (Tableau 9, page 66).

	Nature et fonctions
CD8	co-récepteur des cellules T rôle dans la transduction du signal passant par le TCR
LFA-1 α, β	intégrine rôle dans l'adhésion cellulaire
CD27	Appartient à la famille du récepteur au NGF rôle de signalisation
CD43	rôle dans l'adhésion cellulaire
CD44	rôle dans l'adhésion cellulaire
CD45	phosphotyrosine phosphatase rôle dans la transduction du signal passant par le TCR

Tableau 9: Principales protéines ADP-ribosylées à la surface des lymphocytes T murins. D'après Okamoto S. *et al.* (Okamoto, S. *et al.*, 1998).

En présence de NAD, la modification post-traductionnelle de l'intégrine LFA-1 et du co-récepteur CD8, et l'inhibition subséquente de leurs fonctions semblent responsables des effets inhibiteurs du NAD (Nemoto, E. *et al.*, 1996b; Wang, J. *et al.*, 1996). Dans des études ultérieures, les observations ont été étendues aux lymphocytes T normaux. Comme pour les CTL, l'ADP-ribosylation des protéines conduit *in vitro* à une inhibition de la prolifération des lymphocytes T et de la production des cytokines (Okamoto, S. *et al.*, 1998; Wang, J. *et al.*, 1997). L'injection de NAD *in vivo* provoque également un blocage de la mise en place des réponses immunitaires à médiation cellulaire telles que l'hypersensibilité de type retardé ou la génération de lymphocytes cytotoxiques (Okamoto, S. *et al.*, 1998). Enfin, pour tenter de mieux comprendre les conséquences de l'ADP-ribosylation des protéines membranaires sur la transduction des signaux en aval du TCR, la même équipe a utilisé le lymphome T EL4 transfecté par le gène codant pour l'ART1. Dans ce modèle, l'ADP-ribosylation des protéines inhibe la génération des événements intracellulaires initiés par la ligation du TCR induite par des anti-CD3 tels que la phosphorylation de la kinase p56^{lck} et la génération d'inositol

phosphates (Liu, Z.X. *et al.*, 1999). L'utilisation de la microscopie confocale leur a permis de montrer que dans les cellules traitées par le NAD, la kinase p56^{lck} et la phosphatase CD45 ne sont plus recrutées à proximité du complexe TCR/CD3. Globalement, ces différents travaux suggèrent, comme dans le cas des ART bactériennes, que l'ADP-ribosylation inhibe les fonctions des protéines modifiées et conduit, dans le cas des lymphocytes T à une inhibition de leur activité. Rappelons enfin, comme nous l'avons indiqué plus haut, que l'expression des ART à la surface des cellules T est contrôlée par des métallo-protéases et que l'activation des lymphocytes semble conduire à l'élimination réversible des ART de la surface cellulaire (Kahl, S. *et al.*, 2000; Nemoto, E. *et al.*, 1996a).

Au total, la découverte des ART à la surface des lymphocytes T naïfs chez la souris semble ouvrir une nouvelle voie dans la pharmacologie des nucléotides extracellulaires et du rôle du NAD dans la régulation de l'immunité.

OBJECTIF DES TRAVAUX

L'observation initiale qui a conduit nos recherches est le fait que le NAD, chez la souris, est capable de bloquer la prolifération des lymphocytes T murins à des doses de l'ordre de 1-3 μ M. Ce résultat paraissait d'autant plus surprenant qu'il n'était pas observé chez l'Homme ou le rat et ne pouvait être reproduit avec aucun autre nucléotide ou nucléoside naturel.

Les travaux que nous présentons ont donc cherché à répondre à trois principales questions. La première concerne la nature des protéines membranaires impliquées dans l'effet inhibiteur du NAD. La seconde concerne la nature des effets du NAD. En particulier, nous avons cherché à déterminer s'ils résultent d'une inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'activation cellulaire ou de l'induction d'un processus délétère conduisant à la mort cellulaire. Enfin, le troisième volet des recherches a été consacré à l'étude des événements moléculaires responsables de l'effet du NAD. Ces travaux, comme on va le voir, nous ont conduit à la découverte d'un lien fonctionnel entre les ART membranaires et le récepteur P2X₇. Ainsi, les recherches présentées dans ce mémoire établissent pour la première fois un lien entre la pharmacologie de l'ATP et celle du NAD extracellulaires. Ils suggèrent qu'au-delà des molécules déjà connues, les nucléotides puriques, vraisemblablement relargués par toute cellule en état de stress, seraient des composants importants de la régulation des fonctions immunes. Nous présenterons, dans la dernière partie de ce mémoire les conséquences attendues de nos observations sur le plan de la physiopathologie, de la régulation de la tolérance et de la susceptibilité aux maladies auto-immunes.

RESULTATS

Les travaux que nous rapportons dans ce mémoire sont décrits en détail dans quatre publications, parues ou sous presse auxquelles on pourra se référer.

Article 1 : « Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(adp-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector » (Adriouch, S. *et al.*, 2001).

Article 2 : « A natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X₇ receptor » (Adriouch, S. *et al.*, 2002).

Article 3 : « NAD-induced T cell death: cell surface ADP-ribosylation by ART2.2 activates the cytolytic P2X₇ receptor » (Seman, M. *et al.*, soumis en 2003)

Article 4 : « T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD » (Haag, F. *et al.*, 2003 sous presse)

Pour la clarté de l'exposé, nous décrirons ci-après les observations principales qui ont orienté la démarche et les différentes étapes de notre travail pour conduire à la découverte des liens fonctionnels entre les ART et le récepteur P2X₇ qui autorisent aujourd'hui à envisager que le NAD comme l'ATP puissent participer dans la même direction à la régulation des fonctions des cellules T.

1. Le NAD inhibe la prolifération des lymphocytes T

Notre première approche des effets du NAD sur les lymphocytes de souris a été l'étude de son influence sur la prolifération des cellules spléniques *in vitro*. Nous avons établi que le NAD inhibe la prolifération des lymphocytes T induite par différents activateurs polyclonaux comme la ConA, la PHA, un cocktail PMA-ionomycine ou des anticorps anti-CD3 alors qu'il est sans effet sur la prolifération des lymphocytes B stimulés par le LPS (Article 1). Ces résultats étaient en accord avec d'autres montrant que le NAD inhibe la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ générés *in vitro* dans une réaction lymphocytaire mixte (Wang, J. *et al.*, 1994). Dans nos études, les concentrations requises étaient extrêmement basses puisque l'IC₅₀ du NAD sur la prolifération des lymphocytes T se situaient entre 3 et 5 μM. Ce premier résultat est important à plusieurs égards. En premier lieu, il montre un effet spécifique du NAD sur les lymphocytes T qui ne semble pouvoir être reproduit par aucun autre nucléotide ou nucléoside naturel. Ensuite, comme cela sera discuté plus loin, de telles concentrations semblent avoir une pertinence *in vivo*.

2. Le NAD induit l'apoptose des lymphocytes T

Dès les premières expériences, il est apparu une disparition des cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans les cultures de cellules T stimulées en présence de NAD. Cette observation pouvait s'interpréter comme consécutive à une inhibition de l'activation cellulaire comme à un effet toxique de ce dinucléotide. Afin de tester cette hypothèse, des lymphocytes T purifiés ont été cultivés en présence de 10 μM de NAD et leur viabilité estimée à différents temps par un double marquage annexinV-FITC /iodure de propidium (PI) permettant de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes ou apoptotiques. Cette étude a permis d'établir l'existence d'un effet toxique du NAD sur les lymphocytes T. Cette toxicité est d'ailleurs visible dès la première heure qui suit l'incubation avec le NAD et s'accroît avec le temps pour atteindre après 24h une valeur maximale. Le NAD semble ainsi capable de provoquer la mort de près de 70% des lymphocytes T normaux. Cette approche a également mis en évidence l'existence

d'une fraction de cellules T résistantes aux effets délétères du NAD sur laquelle nous reviendrons. Elle a également confirmé que les lymphocytes B sont insensibles au NAD.

La mort cellulaire peut intervenir selon différentes modalités distinguables morphologiquement et biochimiquement. La mort par apoptose que l'on oppose généralement à la mort par nécrose est définie par la survenue d'altérations cellulaires comprenant une perte de l'asymétrie membranaire entraînant l'exposition de groupements phosphatidyl-sérine (PS) à la surface externe de la membrane, un bourgeonnement de la membrane plasmique, puis, chronologiquement, une fragmentation de l'ADN et une condensation du cytoplasme et du noyau. L'utilisation de l'annexinV-FITC nous a permis de détecter l'exposition de phosphatidyl-sérine à la surface des lymphocytes T incubés avec du NAD. L'exposition de ces groupements PS en l'absence de perméabilité à l'iodure de propidium marque l'engagement des cellules vers un processus apoptotique. De façon tout à fait remarquable, des cellules correspondant à ces critères (PS⁺/PI⁻) sont détectées après seulement 10 min d'exposition à des concentrations de NAD de l'ordre de 1 μ M suggérant que le NAD induit un signal apoptotique très rapide (Article 1).

Afin de confirmer le rôle pro-apoptotique du NAD, nous avons examiné la fragmentation de l'ADN, caractéristique tardive de ce processus de mort cellulaire. La technique TUNEL que nous avons utilisée, qui permet le marquage des extrémités libres d'ADN, a révélé une fragmentation de l'ADN clairement détectable après 6h d'incubation des lymphocytes T naïfs en présence de NAD. Ces résultats ont confirmé qu'au contact du NAD les lymphocytes T s'engagent de manière irrévocable vers une mort cellulaire programmée (Article 1).

3. Spécificité de l'effet apoptotique du NAD

Il n'existe pas de récepteur connu directement sensible au NAD extracellulaire. De plus, le NAD n'est pas supposé *a priori* traverser la membrane plasmique et pénétrer dans les cellules même si cette possibilité a été évoquée par certains auteurs (Sun, L. *et al.*, 2002; Zocchi, E. *et al.*, 1999). Le NAD extracellulaire peut par contre être le substrat d'ecto-

enzymes capables de le dégrader en molécules plus simples. Ces enzymes peuvent être des NAD glycohydrolases telles que CD38 et CD157 ou éventuellement des phosphodiesterases de la famille E-NPP. Les molécules susceptibles d'être formées peuvent elles-mêmes être hydrolysées par d'autres ecto-enzymes de la famille des E-NTPDases ou par la 5'-nucleotidase CD73 (Figure 8, page 52). Suivant cette cascade, le NAD peut donner lieu à la formation de nicotinamide, d'ADPR, d'ADPRc, d'ADP, d'AMP et d'ADO dont nous avons déjà évoqué les effets pharmacologiques. Dans nos expériences, aucune de ces molécules ne s'est révélée capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T à des concentrations inférieures à 100 μ M contrairement au NAD qui est actif à 1 μ M. Ce résultat indique que l'effet pro-apoptotique du NAD ne s'exerce pas au travers de ses métabolites comme l'ADPR ou l'ADPRc, ce qui exclut le rôle de CD38 ou CD157, ni au travers de l'ADP, modeste ligand des récepteurs P2, ni enfin de l'AMP et de l'ADO, ligands des récepteurs P1. La spécificité de l'effet pro-apoptotique du NAD met donc en cause des voies nécessairement originales.

4. Rôle des ART dans l'apoptose induite par le NAD

Les ADP-ribosyltransférases sont des enzymes capables d'utiliser le NAD extracellulaire pour ADP-ribosyler des protéines cibles. Une activité ADP-ribosyltransférase a été détectée à la surface des lymphocytes murins par plusieurs groupes (Okazaki, I.J. *et al.*, 1996a; Prochazka, M. *et al.*, 1991; Wang, J. *et al.*, 1994). Compte tenu de l'existence de différentes ADP-ribosyltransférases chez la souris, notre première approche a consisté à analyser celles qui sont exprimées dans les lymphocytes T. Des études antérieures suggéraient que l'ART1 et les ART2.1 et ART2.2 étaient susceptibles d'être exprimées dans les cellules du système immunitaire (Haag, F. *et al.*, 1998; Okazaki, I.J. *et al.*, 1998). Nos expériences basées sur l'amplification et la détection des ARN messagers codant pour ces différentes enzymes (RT-PCR) ont montré l'existence des transcrits correspondants aux *Art2.1* et *Art2.2* mais pas ceux correspondant à l'*Art1* dans les lymphocytes T matures (Article 1). Nos études ont également confirmé l'absence d'expression de l'*Art2.2* chez les souris NZW résultant d'une délétion du gène (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1995). Enfin, nous avons aussi montré chez C57BL/6

une très forte expression de l'*Art2.2* alors que chez cette souris, le gène de l'*Art2.1* contient un codon « stop » qui conduit à l'arrêt prématuré de sa traduction (Kanaitzuka, T. *et al.*, 1997).

Chez la souris BALB/c, les ART2.1 et ART2.2 sont ainsi présentes à la surface des cellules T. Dans un premier temps, nous avons montré que le pré-traitement des lymphocytes T par une phospholipase C exogène qui, en clivant leur ancrage phosphatidyl-inositol, provoque la libération des protéines glypiées faisait perdre aux cellules T leur sensibilité au NAD. Les ART2.1 et ART2.2 étant liées à la membrane par un groupement GPI pouvaient donc potentiellement être impliquées dans cette sensibilité au NAD. D'autre part, l'incubation des cellules en présence de [³²P]NAD permet de suivre l'activité ADP-ribosyl transférase par le marquage des protéines membranaires. L'étude de l'ADP-ribosylation par cette méthode a confirmé la fonctionnalité des ART présentes sur les lymphocytes T, au moins dans le cas de l'ART2.2. En effet, l'ART2.1, sauf dans des milieux très réducteurs, n'est pas active dans des conditions expérimentales standards (Hara, N. *et al.*, 1999). Chez les souris NZW qui n'expriment que cette iso-enzyme, aucune ADP-ribosylation n'a été détectée en milieu RPMI 1640 sauf en présence de 1mM de DTT. Ainsi, seule l'ART2.2 semblait être active dans les conditions expérimentales standards.

Deux autres séries d'expériences nous ont permis de mettre en cause l'intervention de l'ART2.2 dans les effets du NAD sur les lymphocytes T. La première est l'inhibition de l'apoptose induite par le NAD par des anticorps polyclonaux ou un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-ART2.2 qui, par ailleurs, bloquent l'ADP-ribosylation des protéines. La seconde est l'observation que seuls les lymphocytes T exprimant l'ART2.2, détectée par l'anticorps monoclonal Nika 102, sont sensibles au NAD qui induit chez eux l'exposition rapide des groupements PS. Bien que ces expériences mettent directement en cause l'ART2.2, l'ART2.1 également présente sur les cellules T semble pouvoir jouer un rôle équivalent dans des conditions réductrices appropriées (Résultats non publiés). Ainsi, l'ADP-ribosylation des protéines membranaires par les ART2 paraissait directement mise en cause dans les effets immuno-régulateurs du NAD extracellulaire.

Enfin, l'implication des ART2 dans les effets toxiques du NAD a pu être formellement confirmée chez des souris dont les gènes des deux ART2 ont été invalidés. En collaboration avec l'équipe de F. Koch-Nolte à Hambourg qui a développé ces souris « Knock out », nous avons montré que les lymphocytes des souris doublement déficientes pour l'expression de ces deux ART2 comme celles seulement déficientes pour l'expression de l'ART2.2 sont complètement résistantes à l'apoptose induite par le NAD dans les conditions expérimentales standards (Article 3, (Ohlrogge, W. *et al.*, 2002) et résultats non publiés).

5. Implication d'un second facteur dans l'apoptose des cellules T induite par le NAD

L'implication nécessaire d'un second facteur dans l'apoptose induite par le NAD est venue de la comparaison de différentes souches de souris. Les souris C57BL/6 n'expriment pas l'ART2.1 mais expriment l'ART2.2. à un très haut niveau (Kanaitzuka, T. *et al.*, 1997; Koch-Nolte, F. *et al.*, 1999) et possèdent de ce fait une activité ADP-ribosyltransférase supérieure à celle mesurée chez BALB/c. Cependant, les lymphocytes T des souris C57BL/6 ne sont que très faiblement sensibles aux effets du NAD. Ceci suggère que l'expression de l'ART2.2, bien que nécessaire, n'est pas suffisante pour expliquer les effets du NAD. Par ailleurs, les souris NZW expriment l'ART2.1 mais pas l'ART2.2. et sont donc elles aussi résistantes, en absence de DTT, à l'apoptose induite par le NAD. Pourtant, les lymphocytes T des hybrides [C57BL/6 x NZW] F1, issus de deux lignées résistantes, ont une sensibilité à l'apoptose induite par le NAD analogue à celle des souris BALB/c. La réponse de ces hybrides ne pouvait s'expliquer que par une complémentarité entre l'ART2.2 du parent C57BL/6 et une protéine dont le gène était apporté par NZW qui serait déficiente chez C57BL/6 (Article 1).

6. Identification de P2X₇ comme le second facteur impliqué dans les effets du NAD

L'identification du second facteur impliqué dans la mort cellulaire induite par le NAD est venue d'expériences avec des analogues du NAD. Le [³²P]NAD permet de détecter les protéines qui ont incorporé un groupement ADP-ribose radioactif transféré par l'activité ADP-ribosyltransférase. Cette technique sensible reste néanmoins contraignante du fait de l'utilisation de la radioactivité difficile à manipuler. Une alternative à cette méthode a été développée basée sur l'utilisation de l'etheno-NAD, un analogue du NAD dont la base adénine est modifiée. Un anticorps monoclonal spécifique du groupement etheno-adénosine a été développé par l'équipe de Santella (Young, T.L. *et al.*, 1988). Cet anticorps, 1G4, permet de suivre l'etheno-ADP-ribosylation des protéines membranaires et offre une alternative à l'utilisation de [³²P]NAD (Article 3 et (Krebs, C. *et al.*, 2003)). Ainsi, l'etheno-NAD est apparu comme un substrat des ART. Pourtant, l'etheno-NAD s'est révélé incapable d'induire l'apoptose des lymphocytes T, même à forte concentration. Plus surprenant encore, la pré-incubation des cellules avec 10 µM d'etheno-NAD prévient entièrement des effets du NAD. L'etheno-NAD bien que substrat des ART se comporte donc comme un antagoniste de l'effet apoptotique du NAD sur les lymphocytes T. Cette observation suggérait que le second facteur impliqué dans la réponse des cellules T au NAD était sensible à la modification de la structure de l'adénine. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons testé l'activité de deux autres analogues, le nicotinamide hypoxanthine dinucléotide (NHD) et le nicotinamide guanine dinucléotide (NGD) qui ne diffèrent du NAD que par la nature de la base purique. Le NHD et le NGD, comme l'etheno-NAD, n'induisent pas l'apoptose des cellules T et inhibent l'action du NAD (Article 3). Le NHD et le NGD sont cependant des substrats de l'ART2.2 puisque la préincubation des cellules T avec ces molécules inhibe l'etheno-ADP-ribosylation ultérieure attestée par l'absence de marquage par 1G4.

Ces données suggéraient que l'intégrité de l'adénine du groupement ADP-ribose transféré sur les protéines membranaires était nécessaire à l'induction des effets pro-apoptotiques du NAD. Le second effecteur, prédit par les données génétiques, devait donc

être un récepteur sensible à la structure de l'adénosine ou de l'adénosine phosphate du groupement ADPR transféré par les ART sur les protéines cibles. Ceci conduisait à émettre l'hypothèse que le second facteur était un des récepteurs P1 ou P2 sensibles aux purines.

Nous avons rapidement écarté l'implication d'un récepteur P1 du fait que l'adénosine n'induit aucune toxicité sur les cellules T, même à des concentrations supérieures au millimolaire. Pour ce qui est des récepteurs P2, la situation était différente puisque l'ATP est capable d'induire des effets similaires à ceux du NAD bien qu'à des concentrations 100 fois plus élevées (Article 1 et Article 2). Un récepteur à l'ATP de type P2 pouvait donc correspondre aux critères recherchés. Dans la littérature, le récepteur P2X₇ a largement été impliqué dans les effets cytolytiques des fortes concentrations d'ATP sur les cellules d'origines hématopoïétiques (Di Virgilio, F. *et al.*, 1998; Di Virgilio, F. *et al.*, 2001). Ce récepteur est notamment exprimé sur les lymphocytes T murins chez qui nous avons pu détecter la présence de l'ARNm correspondant par RT-PCR et de la protéine sur gel avec des anticorps polyclonaux du commerce (Article 2). L'une des caractéristiques du récepteur P2X₇ est de former, lorsqu'il est stimulé de manière prolongée, un large pore membranaire perméable aux molécules pouvant atteindre 900 Da (Surprenant, A. *et al.*, 1996). L'ouverture de ce pore permet le passage de molécules fluorescentes à l'intérieur de la cellule. L'incubation des lymphocytes T avec de l'ATP provoque ainsi l'incorporation dose dépendante du YO-PRO-1 ou du BET, ce qui confirme la présence d'un récepteur P2X₇ fonctionnel à la surface des lymphocytes T murins (Article 2).

Bien qu'il n'existe pas d'agoniste sélectif des récepteurs P2, le profil pharmacologique de réponse obtenu avec différents analogues est souvent caractéristique du récepteur impliqué. Dans le cas des lymphocytes T murins, la faible sensibilité à l'ATP ($EC_{50}=300\mu M$) et le profil pharmacologique obtenu (BzATP > ATP > β,γ -meATP) se sont révélés compatibles avec l'implication du P2X₇ dans l'apoptose induite par l'ATP. De plus, la préincubation des lymphocytes T avec les antagonistes connus du récepteur P2X₇ (KN-62 et oATP) inhibait entièrement l'apoptose induite par l'ATP (Article 2). Le récepteur P2X₇ exprimé par les

lymphocytes T murins nous est donc apparu responsable des effets toxiques de l'ATP à forte concentration ($>100\mu\text{M}$).

Compte tenu de ces observations, le récepteur P2X₇ pouvait donc devenir l'effecteur cytotolytique activé par l'ADP-ribosylation induite par les ART2 en présence de NAD. Une étude pharmacologique similaire a donc été entreprise pour évaluer le rôle éventuel du récepteur P2X₇ dans l'apoptose induite par le NAD. Nos résultats montrent que le NAD, comme précédemment l'ATP, est capable de provoquer l'incorporation du YO-PRO-1 ou du BET dans les lymphocytes T mais pas dans les lymphocytes B (Article 3). Cet effet est caractéristique de la formation d'un pore membranaire tel que décrit lors de l'activation chronique du récepteur P2X₇. Il survient dans les 30 min suivant l'addition de NAD et précède à la survenue de la perte de l'intégrité membranaire détectée par l'incorporation de l'iodure de propidium. De plus, les inhibiteurs du récepteur P2X₇ (KN-62 et oATP) bloquent la capacité du NAD à induire à la fois la formation de ce pore et l'exposition des phosphatidyl-sérines à la surface cellulaire laquelle témoigne de l'engagement vers le processus apoptotique (Article 3). Ces résultats suggèrent donc fortement que l'apoptose induite par le NAD implique l'activation du récepteur P2X₇ suite à l'ADP-ribosylation des protéines membranaires.

Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules de la lignée HEK-293 ont été soit simplement transfectées avec le gène codant pour l'ART2.2 ou le P2X₇ soit doublement transfectées par ces deux gènes. Seules les cellules doublement transfectées sont apparues sensibles aux effets du NAD démontrant que ni l'ART2.2 ni P2X₇ seuls ne sont suffisants. Dans ce modèle cellulaire, comme précédemment sur les lymphocytes T, le NAD induit l'exposition des phosphatidylsérines à la surface des cellules HEK ART2.2⁺/P2X₇⁺ et l'incorporation du YO-PRO-1 qui témoigne de l'ouverture du pore membranaire (Article 3). Cependant, nous avons constaté que les doses de NAD nécessaires sont, dans ce modèle cellulaire, largement supérieures à celles qui sont actives sur les lymphocytes T normaux. Cette perte de sensibilité vis-à-vis du NAD indique que d'autres facteurs contribuent probablement à une efficacité optimale du processus. Il peut notamment être envisagé que dans ce modèle cellulaire hétérologue la protéine P2X₇ qui a été démontrée faire partie d'un

vaste complexe protéique ne se trouve pas dans un environnement adapté (Kim, M. *et al.*, 2001).

Enfin, on pouvait encore envisager que le NAD, via les ART puisse entraîner une libération d'ATP endogène qui à son tour activerait le récepteur P2X₇. L'incubation des cellules T en présence de NAD et d'apyrase qui dégrade l'ATP, n'entraînait pas de modification du signal apoptotique induit par le NAD. Cette hypothèse fut donc écartée.

Ainsi, le NAD apparaît comme un effecteur conduisant à faible concentration à l'activation du récepteur P2X₇ via l'ART2.2. Deux hypothèses peuvent être proposées quant au mécanisme. Suivant la première (Figure 9, page 78) le récepteur P2X₇ serait lui-même une cible des ART et son ADP-ribosylation conduirait à son activation. Alternativement, cette activation procéderait de manière indirecte. Une protéine cible des ART, une fois ADP-ribosylée présenterait de façon efficace le groupement ADPR au site de fixation à l'ATP de P2X₇ lors d'interactions étroites protéine-protéine (Figure 10, page 79).

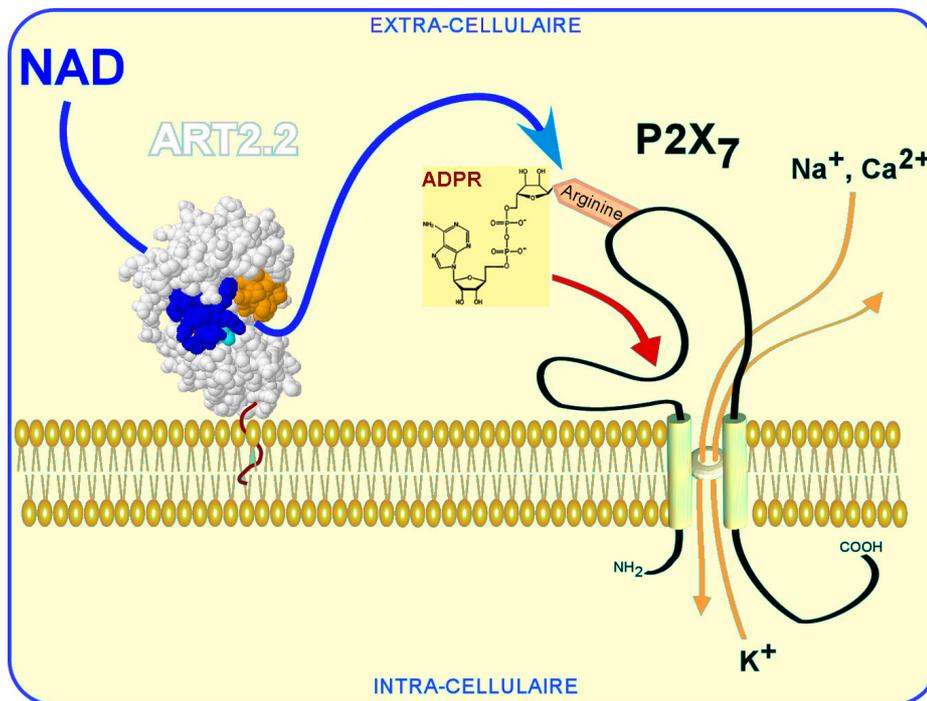


Figure 9: Activation de P2X₇ par le NAD. Selon ce modèle, P2X₇ serait lui-même la cible de l'ART2.2 et son ADP-ribosylation conduirait à l'activation du récepteur.

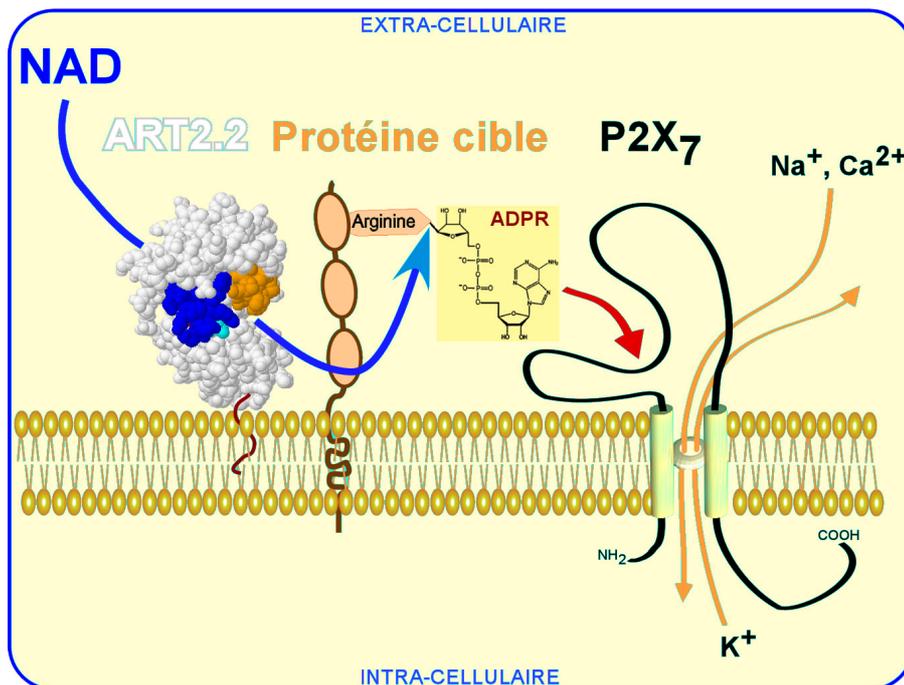


Figure 10: Activation de P2X₇ par le NAD. Selon ce modèle, P2X₇ serait activé par le groupement "ADP-ribose" présenté par une protéine cibles de l'ART2.2.

7. Une mutation ponctuelle du récepteur P2X₇ chez C57BL/6 est responsable de sa résistance à l'effet délétère du NAD sur les lymphocytes T

Les lymphocytes T des souris de la souche C57BL/6 sont, comme nous l'avons mentionné précédemment, résistants aux effets du NAD par comparaison à ceux des souris BALB/c. Ce constat était d'autant plus surprenant qu'il existe, chez C57BL/6 une surexpression de l'ART2.2 (Article 1 et (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1999)). Si, comme nous l'envisagions, le signal apporté par le NAD passait par le récepteur P2X₇, la résistance des souris C57BL/6 devait résulter d'un défaut affectant l'expression ou la fonction du récepteur P2X₇. Une étude comparative de l'expression du gène codant pour la protéine P2X₇ en RT-PCR n'a montré aucune différence évidente du niveau de transcription de ce gène entre les lymphocytes T issus de BALB/c ou de C57BL/6. Cependant, nous avons mis en évidence un

déficit fonctionnel du récepteur P2X₇ exprimé par les lymphocytes T de la souche C57BL/6. En effet, ces lymphocytes répondent plus faiblement à l'ATP et à d'autres agonistes du récepteur P2X₇ que ceux issus de BALB/c. Ainsi, l'ATP paraît peu efficace pour induire l'exposition des phosphatidylsérines à la surface cellulaire (marquage avec l'annexinV), provoquer la formation du pore membranaire (incorporation de YO-PRO-1) ou stimuler un influx calcique (Article 2).

Le déficit fonctionnel apparent du récepteur P2X₇ exprimé chez C57BL/6 nous a conduit à comparer la séquence primaire du gène à celle de BALB/c. Une seule mutation codante a été mise en évidence substituant la proline en position 451 chez BALB/c par une leucine chez C57BL/6 (P451L) (Article 2). La comparaison des séquences déposées dans les bases de données a montré que la proline en position 451 est conservée dans les séquences des gènes orthologues de l'Homme et du rat. Cette mutation ponctuelle P451L se situe dans la partie cytoplasmique du récepteur P2X₇ dans une région présentant des homologies de séquences avec le « domaine de mort » du récepteur au TNF (TNFR1 death domain) et avec les séquences protéiques connues pour interagir avec les domaines SH3 (SH3-binding protein) (Article 2 et (Denlinger, L.C. *et al.*, 2001)). La position 451 se trouve donc dans une région de la protéine probablement impliquée dans la signalisation. Parmi les 14 différentes lignées murines que nous avons analysées, la mutation P451L n'a été détectée que sur les souris C57BL/6, C57BL/10, DBA/1 et DBA/2. Les souris dérivées de souris sauvages (*M. caroli*, *M. spretus*, *M. musculus* et *M. poschiavinus*) portent l'allèle P451 retrouvé chez BALB/c. Il est donc probable que l'allèle P451 représente l'allèle sauvage. L'analyse des fonctions du récepteur P2X₇ dans les lymphocytes de la souche DBA/1, également porteuse de l'allèle mutant, a confirmé l'effet négatif de la mutation P451L sur la sensibilité aux effets apoptotiques de l'ATP (Article 2).

Afin de vérifier que la mutation ponctuelle P451L est effectivement à la base des différences fonctionnelles observées, les cellules de la lignée cellulaire humaine HEK-293 ont été transfectées avec les allèles issus des souris BALB/c ou C57BL/6. Malgré une expression à un niveau comparable de la protéine dans les différents clones testés, les cellules transfectées avec l'allèle mutant L451 ont montré une réponse réduite à l'ATP, tant en termes

d'apoptose, de stimulation de l'incorporation de YO-PRO-1 que d'induction d'un influx calcique (Article 2).

La présence d'une mutation P451L chez DBA/1 et C57BL/6 affectant la fonctionnalité de P2X₇ apporte une preuve génétique d'un lien entre la pharmacologie du NAD et le récepteur P2X₇. En effet les souris DBA/1, comme les souris C57BL/6 manifestent une déficience de la réponse au NAD comme à l'ATP. Ainsi, les défauts affectant l'expression de l'ART2.2 (souris NZW et souris ART2.2^{-/-}) ou ceux affectant la fonction du récepteur P2X₇ (souris C57BL/6 et DBA/1) ou encore l'utilisation de molécules qui bloquent l'activité de l'une ou l'autre de ces protéines (anticorps anti-ART2.2 ou antagonistes du récepteur P2X₇) conduisent à une résistance au NAD. Globalement l'ensemble de ces résultats démontre l'implication et la coopération de l'ART2.2 et du récepteur P2X₇ dans l'apoptose induite par le NAD.

8. Comparaison entre les effets de l'ATP et ceux du NAD sur les lymphocytes T

L'ATP et le NAD induisent tous deux l'apoptose des lymphocytes T murins en activant le récepteur P2X₇. Cependant la voie de l'ATP et celle du NAD diffèrent à certains égards. En premier lieu, les concentrations d'ATP nécessaires pour induire l'apoptose des lymphocytes T sont au moins 100 fois supérieures à celles nécessaires avec le NAD (Article 1, 2, 3). D'autre part, alors qu'à forte concentration l'ATP induit l'apoptose de la quasi-totalité des lymphocytes T, l'apoptose induite par le NAD est restreinte à la population des lymphocytes T qui expriment l'ART2.2. Cette population représente environ 70% des cellules T chez une souris normale (Article 1 et 3). Enfin, dans le cas de l'ATP, il a été décrit que ses effets au travers du récepteur P2X₇ sont réversibles sur les macrophages (MacKenzie, A. *et al.*, 2001). Ces observations nous ont conduit à tester la réversibilité de l'exposition des PS induite par l'ATP ou le NAD. Dans ces expériences, les lymphocytes T ont été incubés avec de l'ATP ou du NAD pendant un temps court (5 min), puis lavés et remis dans du milieu de culture à 37°C.

Le marquage annexinV a été suivi pendant les deux heures suivantes. Nous avons ainsi montré, dans le cas de l'ATP, que lorsque les cellules sont replacées dans un milieu sans ATP, l'exposition des PS se résorbe avec le temps pour finalement disparaître complètement dans les 60 min qui suivent ce traitement (Article 3). Dans ces conditions, les cellules reviennent à un phénotype normal. En revanche, lorsque le NAD est utilisé dans les mêmes conditions expérimentales, l'exposition des PS perdure dans le temps et paraît irréversible (Article 3). Dans le cas de l'ATP, les résultats sont compatibles avec une interaction non covalente de ce ligand avec le récepteur P2X₇. Dans le cas du NAD, la stimulation du récepteur perdure en accord avec le fait que l'ART2.2 induit des ADP-ribosylations covalentes sur ses cibles qui, selon notre modèle, conduisent à l'activation du récepteur P2X₇. Ainsi, une exposition même brève au NAD est vraisemblablement capable de provoquer une stimulation chronique du récepteur P2X₇. Ce mécanisme pourrait avoir un intérêt *in vivo* du fait de la présence des ectoenzymes hydrolysant le NAD. Une exposition de courte durée des lymphocytes avec cette molécule deviendrait suffisante pour induire un signal stable.

9. La sensibilité des lymphocytes T au NAD dépend de leur stade de différenciation

Compte tenu de l'effet pro-apoptotique puissant du NAD sur la majorité des lymphocytes T matures périphériques nous nous sommes intéressés, dans une dernière partie, à la sensibilité au NAD des lymphocytes T en fonction de leur stade de différenciation ou d'activation. La question posée sous-jacente concernait le rôle du NAD dans la sélection du répertoire T dans le thymus et son effet sur les lymphocytes T périphériques quiescents ou activés par l'antigène.

Nous avons montré dans un premier temps que les thymocytes semblent insensibles au NAD (Article 4). Cette insensibilité au NAD des lymphocytes thymiques est compatible avec le fait que les thymocytes immatures CD3^{low} n'expriment pas l'ART2.2 (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1999). Cependant, les thymocytes matures CD3^{high} qui expriment l'ART2.2 sont également

insensibles au NAD (Article 4). Ce résultat surprenant pourrait s'expliquer par l'absence d'expression de P2X₇ dans cette population. A cet égard, il n'existe aujourd'hui aucune preuve formelle de l'expression de ce récepteur sur les thymocytes du fait de l'absence d'anticorps spécifiques, même si des réponses à l'ATP ont été décrites dans cette population cellulaire (Bisaggio, R.D. *et al.*, 2001; Freedman, B.D. *et al.*, 1999; Ross, P.E. *et al.*, 1997). Ces effets peuvent résulter de l'intervention d'autres récepteurs P2X. Enfin, la présence de CD38 décrite sur une faible fraction des thymocytes pourrait participer à la résistance en dégradant le NAD extracellulaire (Lund, F. *et al.*, 1995). Ces observations semblent exclure une participation du NAD à la sélection négative des thymocytes, connue pour impliquer des mécanismes apoptotiques (Kishimoto, H. *et al.*, 2000; Sebzda, E. *et al.*, 1999).

Contrairement aux thymocytes, les lymphocytes périphériques des ganglions lymphatiques ou de la rate de BALB/c sont dans leur vaste majorité sensibles à l'apoptose induite par le NAD (Article 1, 3 et 4). Les cellules T périphériques qui demeurent insensibles au NAD n'expriment pas l'ART2.2 (Article 1). *Ex vivo*, il a été montré que l'ART2.2 pouvait être libérée de la membrane des lymphocytes T récemment activés par un mécanisme impliquant des métallo-protéases membranaires (Kahl, S. *et al.*, 2000; Nemoto, E. *et al.*, 1996b). En accord avec ces observations nous montrons que la pré-activation des lymphocytes T par la PMA (ester de phorbol) ou par des anticorps dirigés contre CD3 et CD28 provoque la libération de l'ART2.2 dans le milieu de culture et la perte concomitante de la sensibilité aux effets du NAD (Article 4). Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T périphériques naturellement résistants *ex vivo* au NAD seraient des lymphocytes qui ont été activés *in vivo*. En accord avec cette hypothèse, les lymphocytes T qui survivent sans activation dans des cultures de 24 h en présence de NAD expriment les marqueurs CD62L^{low}/CD44^{high} qui caractérisent les cellules activées ou mémoires (résultats non publiés). Nous avons également évoqué précédemment la relative résistance au NAD des lymphocytes T qui expriment à leur surface la NADase CD38 (Article 1). Chez la souris cette enzyme semble préférentiellement exprimée sur les lymphocytes T activés (Deterre, P. *et al.*, 2000; Lund, F. *et al.*, 1995). Globalement, ces observations suggèrent que l'activation des lymphocytes T périphériques conduit à une insensibilité au NAD résultant de la perte de

l'ART2.2 et/ou de l'expression de la NADase CD38. En d'autres termes, la sensibilité au NAD peut être considérée comme une propriété du lymphocyte T mature et quiescent.

10. Les sources du NAD extracellulaire

Poser la question du rôle physiologique du NAD dans la régulation de la biologie des lymphocytes T suppose que sa concentration puisse atteindre des valeurs suffisantes dans certaines conditions *in vivo*.

Dans le sérum, la concentration de NAD a été rapportée être de l'ordre de 0.1 μ M (Kim, U.H. *et al.*, 1993) Ainsi, cette concentration serait environ 10 fois inférieure aux doses actives *in vitro*. Cependant, compte tenu des concentrations intracellulaires et intramitochondriales de NAD supérieures au millimolaire, des concentrations micromolaires doivent pouvoir être atteintes localement autour de cellules lésées ainsi que nous l'avons proposé (Article 1, 3 et 4). Pour tenter de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle d'inflammation original induit par l'injection sous cutanée de billes de polyacrylamides (Biogel P100) (Stiffel, C. *et al.*, 1990). Ce modèle, immunologiquement neutre, présente l'avantage de piéger dans les billes poreuses de Biogel les substances solubles libérées dans le site inflammatoire offrant ainsi un accès à leur dosage. En outre, la détermination du volume de Biogel récupéré chirurgicalement permet une évaluation des concentrations réelles des substances solubles. Tous les autres modèles impliquant un rinçage du site inflammatoire n'offrent aucun accès à la détermination des concentrations endogènes initiales faute d'une connaissance du volume du liquide inflammatoire présent *in situ*. En utilisant une méthode de dosage très sensible du NAD (Bernofsky, C. *et al.*, 1973; Jacobson, E.L. *et al.*, 1976), nous avons, grâce à ce modèle, pu déterminer que la concentration de NAD atteint 10 μ M dans le site inflammatoire 12 h après son déclenchement et qu'une concentration supérieure à 1 μ M se maintient encore au moins pendant 4 jours (manuscrit en préparation). Ces résultats montrent donc que des concentrations de NAD suffisamment élevées pour provoquer l'apoptose des lymphocytes T peuvent être atteintes *in vivo* dans des environnements inflammatoires.

Ces observations supposent que seuls des lymphocytes T activés hors du site inflammatoire et n'exprimant plus les ART pourraient survivre dans un environnement où de telles concentrations de NAD sont présentes. Selon ce principe, le NAD préviendrait l'activation inappropriée de lymphocytes T naïfs et en particulier auto-réactifs dans des environnements où les signaux inflammatoires pourraient induire l'expression des molécules du CMH et conduire à la présentation d'auto-antigènes par des cellules présentatrices non professionnelles. Ce schéma rendrait compte du fait que les souris ou les rats déficients dans l'expression de l'ART2 possèdent une susceptibilité accrue aux maladies autoimmunes (Ablamunits, V. *et al.*, 2001; Greiner, D.L. *et al.*, 1987; Haag, F. *et al.*, 1993; Koch-Nolte, F. *et al.*, 1995; Prochazka, M. *et al.*, 1991).

ARTICLE 1

Rapid Induction of Naive T Cell Apoptosis by Ecto-Nicotinamide Adenine Dinucleotide: Requirement for Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 2 and a Downstream Effector¹

Sahil Adriouch,* Wiebke Ohlrogge,† Friedrich Haag,† Friedrich Koch-Nolte,† and Michel Seman^{2*}

Lymphocytes express a number of NAD-metabolizing ectoenzymes, including mono(ADP-ribosyl)transferases (ART) and ADP ribosylcyclases. These enzymes may regulate lymphocyte functions following the release of NAD in injured or inflammatory tissues. We report here that extracellular NAD induces apoptosis in BALB/c splenic T cells with an IC₅₀ of 3–5 μM. Annexin V staining of cells was observed already 10 min after treatment with NAD in the absence of any additional signal. Removal of GPI-anchored cell surface proteins by phosphatidylinositol-specific phospholipase C treatment rendered cells resistant to NAD-mediated apoptosis. RT-PCR analyses revealed that resting BALB/c T cells expressed the genes for GPI-anchored ART2.1 and ART2.2 but not ART1. ART2-specific antisera blocked radiolabeling of cell surface proteins with both [³²P]NAD and NAD-mediated apoptosis. Further analyses revealed that natural knockout mice for *Art2.a* (C57BL/6) or *Art2.b* (NZW) were resistant to NAD-mediated apoptosis. Labeling with [³²P]NAD revealed strong cell surface ART activity on T cells of C57BL/6 and little if any activity on cells of NZW mice. T cells of (C57BL/6 × NZW)F₁ animals showed strong cell surface ART activity and were very sensitive to NAD-induced apoptosis. As in BALB/c T cells, ART2-specific antisera blocked cell surface ART activity and apoptosis in (C57BL/6 × NZW)F₁ T cells. The fact that T cells of F₁ animals are sensitive to rapid NAD-induced apoptosis suggests that this effect requires the complementation of (at least) two genetic components. We propose that one of these is cell surface ART2.2 activity (defective in the NZW parent), the other a downstream effector of ADP-ribosylation (defective in the C57BL/6 parent). *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 196–203.

While NAD concentrations in the cytoplasm lie in the millimolar range, concentrations of extracellular NAD are usually submicromolar in serum. However, NAD can be released into the extracellular environment by lytic and nonlytic mechanisms, e.g., following cell damage or acute cell death in injured and inflammatory tissues, and could participate in the regulation of immune functions. Indeed, lymphocytes express a number of membrane-bound NAD-metabolizing ectoenzymes, including CD38 and NAD-dependent ADP ribosyltransferases.

Mono(ADP-ribosyl)transferases (ARTs)³ catalyze a posttranslational modification of proteins by transferring the ADP-ribose moiety of NAD to specific amino acids, e.g., arginine residues, on target proteins. These enzymes have well-known regulatory functions in the prokaryotic world and usually inactivate the function of target proteins (1). They also correspond to various bacterial toxins that have potent effects on mammalian cells (2). More re-

cently, several ARTs have been cloned from different tissues. Five groups of ART-encoding genes, denoted *ART1* to *ART5*, have been identified in the mouse, rat, rabbit, and human, based on sequence homology and genomic organization (3). *ART1*–*ART4* isoforms correspond to 30- to 40-kDa GPI-anchored cell surface ARTs, whereas *ART5* is not GPI-linked and may be secreted (4, 5). Their biological function is not fully understood, but they seem to play an important role in the regulation of myogenesis or long-term potentiation in hippocampal neurons, for instance, or in the regulation of lymphocyte functions (5, 6).

The first evidence supporting a role of ART in the immune system came from experiments in rats. In this species, there is a single locus encoding ART2 with two alleles (*ART2^a* and *ART2^b*), both expressed as 25- to 35-kDa GPI-anchored maturation markers on the surface of T lymphocytes (7). *ART2⁺* T cells have been found to exert a regulatory role in models for autoimmune insulin-dependent diabetes mellitus. Indeed, diabetes prone BB-DP rats have reduced ART2 expression, and the transfer of *ART2⁺* T cells from their BB-DR-resistant counterparts confers protection. Failure to develop this T cell subset is thus one of the genetically determined factors leading to enhanced susceptibility for autoimmune diabetes (8).

The mouse homologue of the rat *ART2* gene has been tandemly duplicated to produce two loci (*Art2a* and *Art2b*) with multiple alleles (9, 10). In mice, ART activity has also been detected on lymphoid cells, including T cell lymphomas (11, 12), splenocytes (13, 14), and activated CTL (15) and is believed to participate in the regulation of cell functions. A 35-kDa GPI-anchored ART was found to mediate inhibition of proliferation and cytotoxic activity of CTL cell lines in the presence of extracellular NAD (16). A similar NAD-mediated inhibitory effect has more recently been reported

*Laboratoire d'Immunodifférenciation, Université Denis-Diderot Paris 7, Paris, France; and †Institute for Immunology, University Hospital, Hamburg, Germany

Received for publication February 5, 2001. Accepted for publication April 27, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant SFB 545/B9 (to F.H. and F.K.-N.S.). S.A. is recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Michel Seman, Laboratoire d'Immunodifférenciation, EA 1556, Université Denis-Diderot Paris 7, CP 7124, Tour 54, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France. E-mail address: seman@paris7.jussieu.fr

³ Abbreviations used in this paper: ART, mono(ADP-ribosyl)transferase; PI-PLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; ADPR, adenosine diphosphoribose; cADPR, cyclic adenosine diphosphoribose; PI, propidium iodide.

on the proliferation of normal peripheral T cells in vitro (17). ARTs encoded by *Art1*, *Art2a*, *Art2b*, *Art3*, *Art4*, and *Art5* can potentially mediate these effects, although neither *Art5* nor *Art3* are expressed on normal lymphoid cells (5, 18, 19). ART1 is a GPI-anchored protein that has been considered as a candidate ART responsible for this regulation because it was cloned from T cell lymphomas (20). However, ART1 is expressed at low levels in lymphoid tissues and predominates in heart and skeletal muscles (21). By contrast, *Art2a* and *Art2b* mRNA are expressed at higher level in lymphoid tissues (9, 10). Moreover, the recent development of specific mAbs has allowed us to demonstrate that ART2.2 is selectively present on mature T lymphocytes from most mouse strains although at different levels (22).

Deficient expression of ART2.1 and ART2.2 has been reported in several inbred mice. In C57BL/6, the *Art2a* sequence contains a stop codon leading to the synthesis of a truncated protein with no enzymatic activity (23). Reciprocally, NZW mice suffer from a deletion of the *Art2b* gene (24). Like in rats, defective expression of ART2s has been proposed as one of the factors influencing the onset and/or progression of autoimmune diseases (24, 25).

To date, most experiments concerning the role of ARTs and the effect of extracellular NAD on T lymphocytes have been performed in C57BL/6 mice that express ART2.2 at a very high level but lack functional ART2.1 on their surface (22–24). The potential role of differential ART expression on NAD-induced regulation of immune functions has not been investigated. Experiments reported herein address this issue by comparing the effect of extracellular NAD on T lymphocytes from appropriate inbred mice. We demonstrate that NAD triggers rapid induction of apoptosis in normal peripheral T cells from BALB/c and (C57BL/6 × NZW)_{F1} mice but not from natural knockout mice for ART2a (C57BL/6) or ART2b (NZW).

Materials and Methods

Reagents

FITC-conjugated anti-CD3 ϵ (145-2C11) and PE-conjugated anti-B220 (RA3-6B2) mAbs used for fluorescence staining were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA). FITC-conjugated anti-CD8a (CT-CD8a) and PE-conjugated anti-CD4 (CT-CD4) were obtained from Caltag Laboratories (South San Francisco, CA).

Animals

BALB/c and C57BL/6 mice were maintained in the animal facilities of the Institut Jacques Monod (Paris, France) and of the University Hospital (Hamburg, Germany). NZW/olaHsd mice were purchased from Harlan (Oxon, U.K.). *F1* hybrids from C57BL/6 females mated with NZW males were bred and are designated elsewhere as B6NWF₁. The offspring of the reciprocal mating were also tested and gave similar results (not shown). The Wistar rat R8 and the outbred rabbit 12760 were obtained from and maintained at the central animal facility of the University Hospital.

Antibodies

Preimmune sera were prepared from blood obtained by retroorbital bleeding from rat R8 and by draining of the ear vein from rabbit 12760 before ballistic DNA immunization with 8–12 shots (1 μ g DNA coated on 1- μ m gold particles) of pME.ART2.2, an expression vector for GPI-anchored, FLAG-tagged ART2.2, using a gene gun (Bio-Rad, Hercules, CA). Three booster immunizations were performed at 4- to 6-wk intervals. Animals received a final boost of purified recombinant ART2.2-human IgG1Fc fusion protein (50 μ g in 500 μ l PBS *i.v.*). Five days later, animals were sacrificed by heart puncture and immune sera were prepared. The specificity of antisera was determined by indirect immunofluorescence analyses using EL4 lymphoma cells and EL4 cells transfected with expression constructs for mouse ART1, ART2.1, or ART2.2. Immune sera 12760 and R8 specifically reacted with ART2.1 and ART2.2 transfectants but not with ART1 transfectants. ART2.2-specific rat IgG2a mAb (designated Nika-102) was generated following fusion of R8 splenocytes with Sp2/0 myeloma cells as described previously (22).

Cell preparation and proliferation assay

Splenocyte suspensions were prepared aseptically in cold PBS containing 10% heat-inactivated FCS. Erythrocytes were removed by treatment with NH₄Cl (160 mM, 3 min). Cells were then washed, resuspended in complete RPMI 1640 medium containing 5×10^{-5} 2-ME, 0.2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 20 mM HEPES, and 10% FBS (all culture reagents were from Life Technologies, Grand Island, NY). T cells were purified by two passages over nylon wool columns. Purified T cells contained >80% living T cells and <10% B cells as determined by flow cytometry. For *in vitro* stimulation, spleen cells or purified T cells were cultured for 2 days at 37°C in 96-well flat-bottom tissue plates (2×10^5 cells/well) either coated with 10 μ g/ml anti-CD3 ϵ (145-2C11) mAb or in the presence of 3 μ g/ml Con A, 10 ng/ml PMA plus 100 ng/ml ionomycin (I0634; Sigma, St. Louis, MO), 4 μ g/ml PHA, or 125 μ g/ml LPS. Proliferative response was assayed by adding 0.5 μ Ci/well of [*methyl*-³H]thymidine (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA). After 8 h, cells were harvested (Filtermate 196; Packard, Meriden, CT), and the radioactivity incorporated into DNA was counted (TopCount; Packard).

Immunofluorescence analysis, detection of apoptotic cells, and treatment with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)

Standard procedures were used for immunofluorescence staining. Briefly, 1×10^6 cells were washed twice in FACS buffer (CellWash; Becton Dickinson, Mountain View, CA). They were then resuspended in 100 μ l FACS buffer containing 1 μ g of each mAb. After 30 min of incubation at 4°C, cells were washed twice and resuspended in 300 μ l FACS buffer before analysis by flow cytometry on a FACSCalibur (Becton Dickinson).

Detection of apoptotic cells was performed by annexin V/propidium iodide (PI) staining as previously described (26). A second method was used to detect and quantify apoptosis based on TUNEL of DNA strand breaks (27). Briefly, cells were washed twice in PBS containing 1% BSA and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Cells were washed at 4°C and permeabilized with sodium citrate buffer containing 0.1% Triton X-100 for 2 min on ice. After washing, cells were incubated with FITC-dUTP in the presence of TdT for 1 h at 37°C using the Cell Death Detection kit (Roche Diagnostic Systems, Somerville, NJ). Following incubation and washing, cells were counterstained with PI (0.05 μ g/ml) in FACS buffer containing 200 μ g/ml DNase-free RNase (Roche Diagnostic Systems). After 30 min of incubation at room temperature, cells were analyzed by flow cytometry.

In some experiments, lymphocytes were treated with PI-PLC before incubation with NAD and quantification of apoptosis using annexin V/PI staining. Cells were incubated for 30 min at 37°C in RPMI 1640 (2×10^7 cells/ml) containing 10 U/ml PI-PLC (Sigma). They were then suspended at 1×10^6 cells/ml in complete RPMI 1640 and incubated 1 h at 37°C with or without NAD before detection of apoptosis.

ADP-ribosylation of proteins

ADP-ribosylation of membrane proteins was analyzed by SDS-PAGE after incubation of cells with [³²P]NAD as previously described (17) with some modifications. Briefly, 2×10^6 purified T lymphocytes were incubated in 100 μ l complete RPMI 1640 medium containing 10 μ Ci [³²P]NAD (350 μ Ci/mmol; ICN Pharmaceuticals), 1 mM ADP-ribose (Sigma), 100 μ M cold NAD, and 1 μ l protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma) at 37°C for 1 h. T lymphocytes were then washed three times in cold RPMI 1640 to remove unbound radioactivity. Crude cell lysates were obtained by suspension of cell pellets in lysis buffer (PBS containing 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF), followed by incubation on ice for 30 min. Insoluble material was pelleted by centrifugation ($12,000 \times g$ at 4°C for 15 min). Supernatants were collected. Proteins were separated by SDS-PAGE (10% gel), and dried gels were exposed to x-ray films at -70°C for 4 days using intensifying screens.

RT-PCR analysis of *Art1*, *Art2a*, and *Art2b* expression

The relative expression of the *Art1*, *Art2a*, and *Art2b* genes was analyzed by semiquantitative RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from either 2×10^7 purified T cells from BALB/c, C57BL/6, NZW, and B6NWF₁ mice or BALB/c skeletal muscle using the RNA Plus kit (Quantum-Appligene, Strasbourg, France). cDNA was synthesized from 3 μ g of total RNA in a volume of 33 μ l using the first-strand cDNA synthesis kit and oligo(dT)₁₈ as primers (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) according to manufacturer's recommendations. The cDNA concentration of all samples was adjusted after pilot PCR for β -actin using forward 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' and reverse 5'-TA AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' primers. PCR were conducted

in 20- μ l reaction volumes containing 1 μ l cDNA, 1 \times PCR buffer, 2.5 U *Taq* polymerase, 1.5 mM MgCl₂ (all from Bioline, London, U.K.), 100 μ M dNTPs (Roche Diagnostic Systems) and 5 pmol of each primer. PCR was performed on a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Cambridge, MA) for 30–40 cycles of 92°C, 60°C, and 72°C, 1 min each. Specific primers were derived from separate exons in nonconserved regions of *Art1*, *Art2a*, and *Art2b* deduced from the published sequences (GenBank accession numbers X95825 (*Art1*); X52991 (*Art2a*), and X87612 (*Art2b*)). Enzymatic digestion confirmed the specificity of all PCR products (not shown). The following primers were used: for *Art1*, forward *ADPRT* 5'-TGCTGGCCTA CACCGCCAAC-3' and reverse 5'-TCAACATCGGGTAAAGTTGCT-3' or forward *ADRT* 5'-GAGCCACCGATCTCGCGGTG-3' and reverse 5'-AGTTGACCAGCCTTCTTCAGTC-3'; for *Art2a*, forward *Art2a* 5'-ATC-CACAGAAGCCTTAATGAG-3' and reverse 5'-CTACGGCTCAG CAAGAGTAA-3'; for *Art2b*, forward *Art2b* 5'-CCTCGTATAGATT TAACAG-3' and reverse 5'-CTACGGCTCAGCAAGAGTAA-3'. PCR products were analyzed on 1% agarose gels and ethidium bromide staining.

Results

Expression of ART isoforms in T lymphocytes

Before analyzing the effect of extracellular NAD on lymphocytes, we determined the expression of *Art2a*-, *Art2b*-, and *Art1*-encoded ART isoforms on nylon-purified T cells from BALB/c, C57BL/6, NZW, and B6NWF₁ mice by RT-PCR. As illustrated in Fig. 1, *Art2a* mRNA was present in T cells from BALB/c mice and, at an apparently lower level, in cells from NZW and B6NWF₁ animals. In C57BL/6, a low *Art2a* signal was detected, but this sequence contains an in-frame stop codon as reported previously (23). *Art2b* was transcribed at high level in C57BL/6 mice but at lower level in BALB/c and in B6NWF₁ hybrids. This was consistent with results obtained by staining with ART2.2-specific Nika-102 mAb as already reported (22). As expected, *Art2b* transcripts were absent in ART2.2-deficient NZW mice (24).

Importantly, *Art1*-specific transcripts were not detected in T lymphocytes from any of the strains tested, even though two different pairs of primers were used. By contrast, they were readily amplified from skeletal muscle of BALB/c mice. Although it has been observed that transfection of *Art1* into T lymphoma cells causes inhibition of TCR signaling in the presence of NAD (28), our data show that ART1 is not expressed on normal murine T lymphocytes and thus cannot mediate a potential effect of extracellular NAD.

Ecto-NAD selectively inhibits T cell activation

It has previously been reported that extracellular NAD suppresses the proliferation of C57BL/6 mouse T cells. We wondered whether the differential expression of *Art2a* and *Art2b* would influence the sensitivity to NAD-mediated suppressive effects on T cell func-

tions. To address this question, we first compared the effects of extracellular NAD on spleen cell proliferation induced by Con A in BALB/c and C57BL/6 mice (Fig. 2A). In both strains, cell proliferation was strongly inhibited by low concentrations of NAD with an IC₅₀ in the range of 3–5 μ M. The proliferative response was also blocked by NAD in B6NWF₁ mice, whereas NZW T cells were resistant. The effect of NAD on BALB/c splenocytes was specific to T cells, as previously reported for C57BL/6 lymphocytes (17), because LPS-induced B cell proliferation was not affected (Fig. 2B). We further tested the effect of NAD on the proliferation of nylon-purified T cells induced by Con A, PHA, anti-CD3 mAb, or PMA-ionomycin. Fig. 2C shows that NAD inhibited the response irrespective of the activation pathway, including the direct stimulation of cytoplasmic protein kinase C by PMA and ionomycin. This indicated that the effect of NAD, at least in BALB/c mice, was not caused by an early blockage of the transmembrane signaling pathway.

Inhibition of cell proliferation could potentially reflect a direct toxic effect of ecto-NAD on T lymphocytes. This was tested by incubating nylon-purified T cells from the different strains with 10 μ M NAD. Cell viability was followed over 48 h by staining with

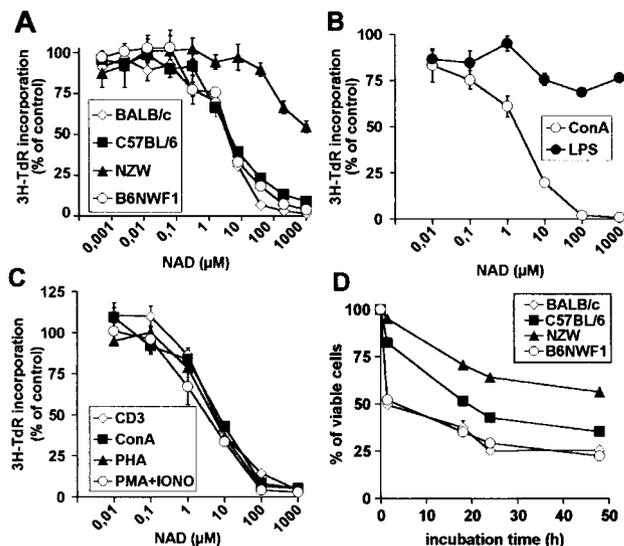


FIGURE 2. Effect of NAD on lymphocyte proliferation and viability. Cells were cultured in presence of NAD, and [³H]TdR incorporation was measured on day 2 (A–C). A, Splenic cells from BALB/c, C57BL/6, NZW, or B6NWF₁ mice were cultured with Con A. B, BALB/c spleen cells were cultured with Con A or LPS. C, Purified T cells from BALB/c were cultured with Con A, anti-CD3 mAb, PHA, or PMA plus ionomycin. Results represent the mean cpm of triplicate assays from one experiment of three and are given as the percentage of the mean cpm of controls without NAD. The proliferative responses of splenocytes to Con A, irrespective of mice strains, were in the range of 100,000 cpm, whereas thymidine incorporation of nonactivated control cells was in the range of 600 cpm. The proliferative response of BALB/c splenocytes to LPS was in the range of 60,000 cpm, control cells in the range of 300 cpm. The proliferative responses of BALB/c-purified T cells to Con A were in the range of 50,000 cpm, to coated CD3 mAbs in the range of 70,000 cpm, to PHA in the range of 40,000 cpm, and to PMA plus ionomycin (IONO) in the range of 90,000 cpm, whereas proliferation of nonstimulated control cell was under 800 cpm. D, Cells were cultured in the presence of 10 μ M NAD, and cell viability was followed over 48 h by staining with annexin V and PI to determine apoptotic and dead cells, as described in *Materials and Methods*. Assays were performed in triplicate, and results represent mean numbers of viable cells (nonapoptotic and non-PI-stained cells) from one experiment of two, given as the percentage of the mean viable cell numbers in controls without NAD. Vertical bars correspond to SDs.

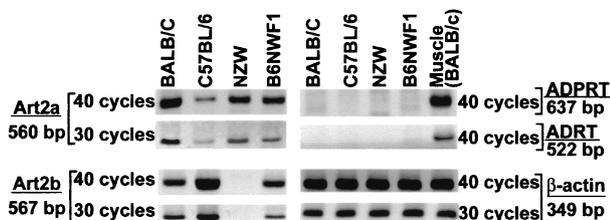


FIGURE 1. RT-PCR analysis of *Art1*, *Art2a*, and *Art2b* gene expression in T lymphocytes from different mice. Total RNA from purified splenic T lymphocytes was reverse transcribed and amplified by PCR using *Art2a* (*Art2a*), *Art2b* (*Art2b*), or *Art1* (*ADPRT* or *ADRT*) specific primers as described in *Materials and Methods*. cDNA concentration was adjusted following pilot PCR for the β -actin gene using specific primers (β -actin). PCR products were analyzed on 1% agarose gels with ethidium bromide staining. Typical results representative of three independent experiments are presented.

annexin V and PI to detect apoptotic and dead cells. A rapid fall of cell viability was observed as early as 1.5 h after incubation of BALB/c and B6NWF₁ cells (Fig. 2D). NZW T lymphocytes were much less affected even after 48 h. An intermediate and slower toxicity of ecto-NAD was observed on C57BL/6 T cells. At 48 h, cell viability was rather similar in all mice except NZW. This was in good agreement with the inhibitory effect of ecto-NAD on T cell proliferation, but suggested a differential mechanism of toxicity between C57BL/6 and BALB/c or B6NWF₁ mice.

To test whether CD4 and CD8 subsets were equally sensitive to NAD toxicity, BALB/c spleen cells were incubated with 50 μ M NAD for 48 h and were then analyzed by flow cytometry (Fig. 3). In the absence of NAD, the CD4:CD8 ratio was close to 2. With 50 μ M NAD, most T cells were eliminated but the CD4:CD8 ratio remained unchanged. This demonstrated that extracellular NAD has a direct toxic effect on both naive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the absence of additional stimulus. The results also confirmed that B220⁺ B cells were not sensitive to NAD toxicity.

Rapid induction of T cell apoptosis by NAD in BALB/c and B6NWF₁ mice

The rapid toxic effect of NAD on naive T lymphocytes from BALB/c and B6NWF₁ mice could result from necrosis or from the induction of programmed cell death. To address this issue, purified splenic T cells from BALB/c or C57BL/6 mice were incubated for 1.5 h with NAD and then stained with annexin V/PI. As illustrated in Fig. 4A, NAD at 10 μ M induced apoptosis of T lymphocytes from BALB/c but not from C57BL/6 mice. T cell apoptosis was dependent on the NAD concentration added to cultures (Fig. 4B) and could be detected as early as 10 min after incubation (data not shown). C57BL/6 mice could thus be considered as resistant to NAD-induced apoptosis as previously suggested (17). Analysis of DNA strand breaks by TUNEL after 6 h of incubation confirmed that BALB/c T cells were sensitive to NAD-induced apoptosis (Fig. 4C). Again, only a small fraction of C57BL/6 T cells were engaged into programmed cell death. Taken together, these observations indicated that ecto-NAD blocks T cell activation in both BALB/c and C57BL/6 mice, but selectively induces rapid apoptosis in BALB/c mice. As expected from their resistance to NAD-mediated inhibition of T cell proliferation, NZW T cells were also resistant to NAD-mediated apoptosis. Interestingly, apoptosis was induced in B6NWF₁ T cells, with similar kinetics as in BALB/c, although both their C57BL/6 and NZW parents were resistant

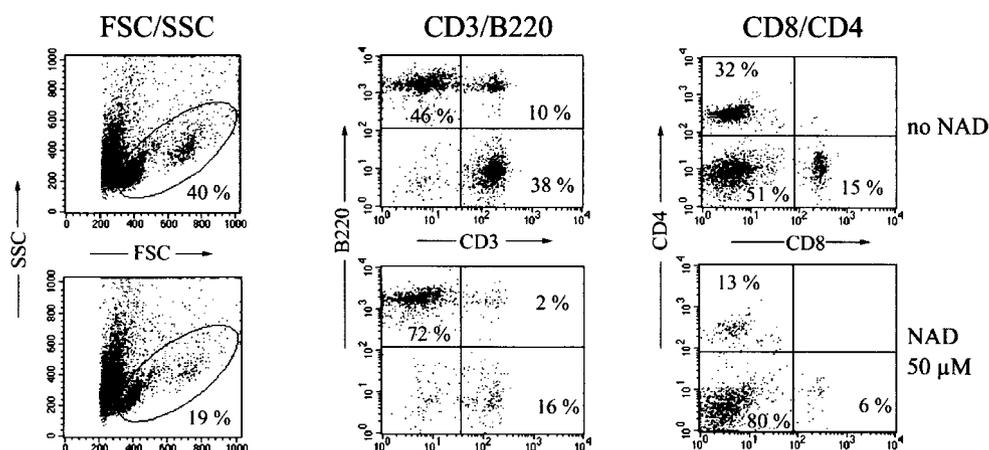
(Fig. 4). This demonstrated that at least two genetic factors are involved in NAD-induced apoptosis.

Apoptosis is mediated by NAD and involves GPI-anchored cell surface proteins

The observation that NAD-induced apoptosis in BALB/c and in B6NWF₁ T cells raised the question of the molecular mechanism underlying this effect. Extracellular NAD cannot penetrate into cells but can be degraded by several enzymes, including NAD-glycohydrolases such as CD38 (29) and phosphodiesterases such as PC-1 (30). These enzymes can transform NAD into metabolites that could deliver signals of programmed cell death (31). These metabolites include adenosine, ADP, AMP, nicotinamide, ADP-ribose (ADPR), and cyclic ADP-ribose (cADPR). To test the possibility that the toxic effect of NAD was mediated by one of these metabolites rather than by NAD itself, purified T lymphocytes from BALB/c mice were incubated for 30 min with NAD metabolites, and the relative number of apoptotic cells was evaluated. As illustrated in Fig. 5A, apoptosis was induced by incubation with NAD but not by any other NAD metabolites or derivatives tested. This demonstrated that the apoptotic signal was dependent on a surface protein acting as a direct NAD acceptor. The role of P1 purine receptors, which bind adenosine, and of P2 purine receptors, which bind ATP, ADP, UTP, and to a lesser extent NADP (32, 33), was ruled out. Results also excluded the possible intervention of CD38, which is only expressed on a small fraction of murine T lymphocytes (34), because no effect was observed with ADPR or cADPR. As also shown in Fig. 6, double staining of B6NWF₁ T cells with CD38 and annexin V after incubation with increasing concentrations of NAD revealed that T cells engaged into apoptosis belonged to the CD38⁻ population and that CD38⁺ cells were resistant.

ARTs expressed on the cell membrane are GPI-anchored proteins, which directly bind NAD and transfer the ADP-ribose moiety from NAD onto other cell surface proteins. It is thus conceivable that they are involved in NAD-mediated apoptosis. Direct evidence for the involvement of GPI-anchored proteins was brought by treatment of cells with bacterial PI-PLC. Previous studies have shown that this treatment almost completely dislodges ART activity from the membrane of CTL cell lines (15). If GPI-anchored ARTs were involved in the NAD-mediated apoptotic effect, PI-PLC treatment should result in resistance to NAD-induced apoptosis. Results in Fig. 5B support this prediction by showing

FIGURE 3. Toxicity of NAD for CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Splenocytes from BALB/c mice were cultured with or without NAD. Cells were analyzed by flow cytometry after 2 days. Data are from one of three independent experiments. SSC, side scatter; FSC, forward scatter.



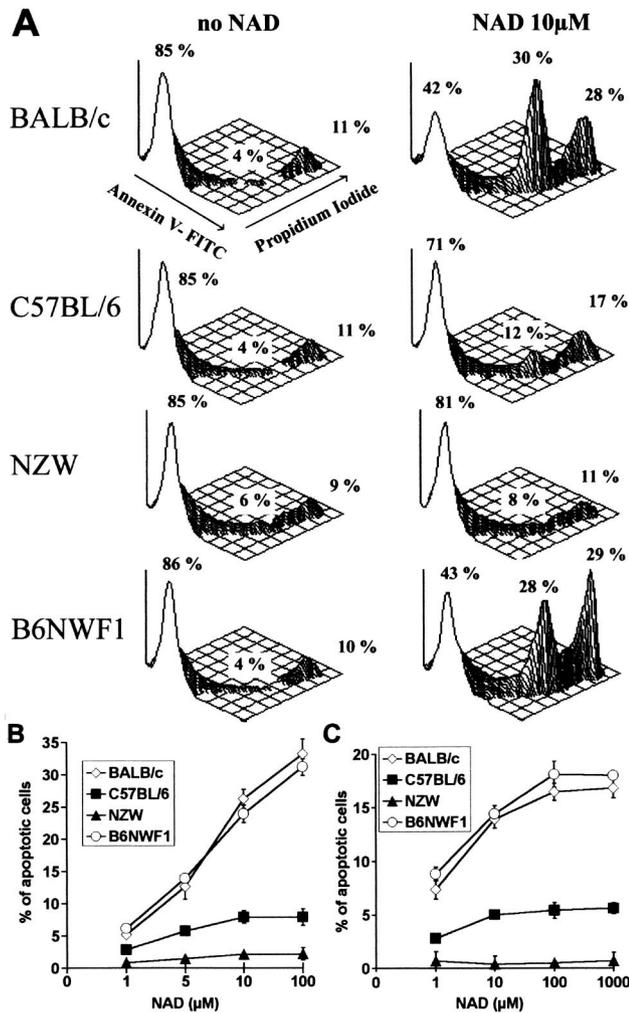


FIGURE 4. Induction of apoptosis by NAD. *A*, Nylon-purified T lymphocytes from BALB/c, C57BL/6, NZW, and B6NWF₁ mice were incubated in the presence or absence of 10 µM NAD for 90 min before annexin V/PI staining. *B*, Cells were incubated as in *A* with different concentrations of NAD. Apoptosis is expressed as the mean percentage of annexin V⁺/PI⁻ cells from three independent experiments upon subtraction of the respective percentage in controls. *C*, Cells were incubated for 6 h with different concentrations of NAD before determination of apoptosis by TUNEL assay. Results correspond to the mean percentage of apoptotic cells from three independent tests. Vertical bars represent SD.

that removal of GPI-anchored proteins leads to concomitant loss of sensitivity to extracellular NAD.

Direct involvement of ART activity in the apoptotic process

We took advantage of a recently developed ART2.2-specific mAb and of ART2-specific antisera to evaluate the functional role of ART2 and ADP-ribosylation in NAD-mediated T cell apoptosis. In a first series of experiments, we used Nika-102, a mAb that binds ART2.2 (22) but does not inhibit its enzymatic activity (data not shown), to follow cells undergoing apoptosis in the presence of NAD. Nylon-purified T cells were incubated with different concentrations of NAD for 1.5 h and then double stained with Nika-102 and annexin V. As illustrated in Fig. 7, ~66% of T cells from B6NWF₁ mice were ART2.2⁺. With increasing concentrations of NAD, the number of cells undergoing programmed cell death increased concomitantly with a diminution of the ART2.2-expressing population. Furthermore, annexin V⁺ cells were largely restricted to the Nika-102⁺ population. By contrast, the fraction and

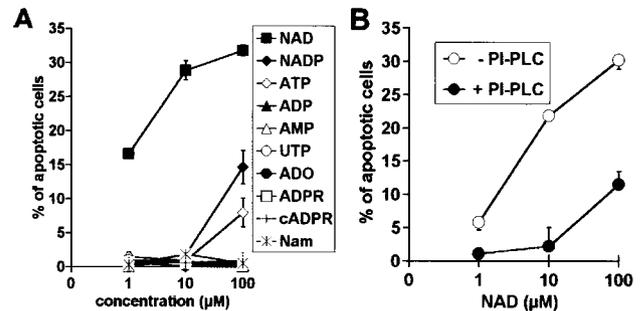


FIGURE 5. Induction of apoptosis by different nucleotide metabolites and effect of PI-PLC treatment on NAD-induced apoptosis. *A*, Purified T cells from BALB/c mice were cultured with the indicated compounds at 37°C for 30 min before annexin V/PI staining. Results are expressed as the mean percentage of apoptotic cells from three independent assays. *B*, Purified T cells were treated with PI-PLC as described in *Materials and Methods* and incubated for 1 h with NAD before quantification of apoptotic cells by annexin V/PI staining. Each point corresponds to the mean of three independent experiments. Vertical bars represent SD.

number of ART2.2⁻ cells, which were not labeled by annexin V, remained unchanged. Similar results were obtained with BALB/c T cells (not shown). These observations demonstrated that the cells committed to apoptosis by NAD were only those expressing ART2.2 on their surface.

We then tested the effect of polyclonal rabbit and rat Abs raised against ART2.2 on apoptosis. BALB/c or B6NWF₁ T lymphocytes were incubated with serial dilutions of K12760 or R8 serum and NAD. Whereas preimmune sera did not prevent apoptosis, ART2-specific Abs from R8 (not shown) and K12760 selectively blocked cell death (Fig. 8). As illustrated below (Fig. 9), this was consistent with the ability of these Abs to inhibit ART2-transferase activity. Together, this demonstrated that NAD-mediated apoptosis requires ART2-mediated ADP-ribosylation of membrane proteins.

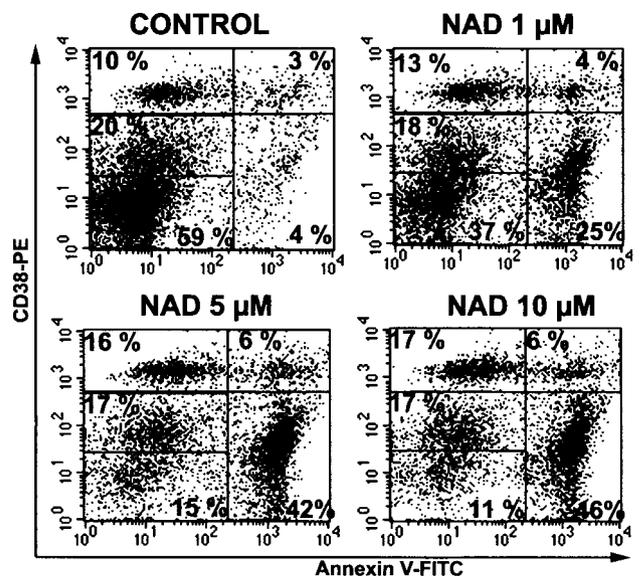


FIGURE 6. CD38⁺ cells are less sensitive to NAD-mediated apoptosis than CD38⁻ cells. Nylon-purified T lymphocytes from B6NWF₁ mice were incubated in the presence of NAD for 30 min before annexin V/CD38 staining. CD3/CD38 and B220/CD38 control staining revealed the presence of 15–17% CD38⁺ T cells and 8–10% contaminant CD38⁺ B cells (data not shown). Viable cells were gated based on forward and side scatter and analyzed by flow cytometry. The percentage of gated cells in each quadrant is given. Data are from one of two independent experiments.

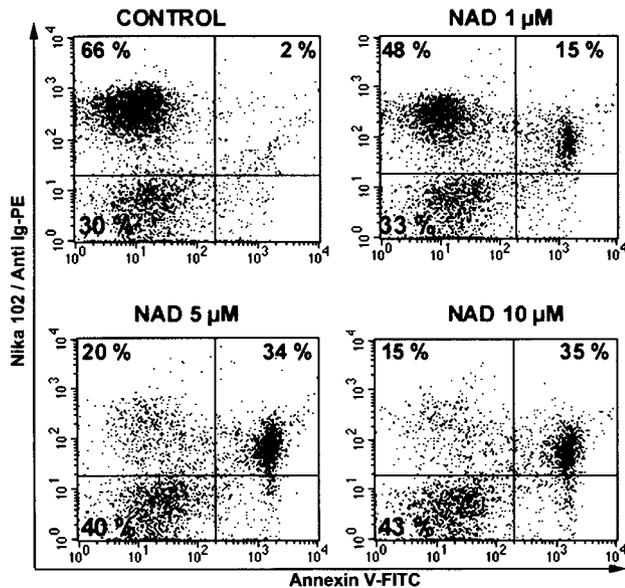


FIGURE 7. Only ART2.2⁺ cells are sensitive to NAD-mediated apoptosis. Nylon-purified T lymphocytes from B6NWF₁ mice were incubated in the presence of NAD for 60 min before annexin V-FITC and Nika-102/anti-rat Ig-PE staining. CD3/Nika-102 and B220/Nika-102 control staining revealed the presence of 65–67% ART2.2⁺ T cells, 23–25% ART2.2⁻ T cells, and 8–10% ART2.2⁻ contaminant B cells (data not shown). Viable cells were gated based on forward and side scatter and analyzed by flow cytometry. The percentage of gated cells in each quadrant is given. Data are from one of two independent experiments.

Membrane protein ADP-ribosylation on cells expressing ART2.1, ART2.2, or both.

The presence of ART(s) on naive T cells predicts that incubation with radioactive NAD should result in labeling of cell surface proteins. To test this prediction, nylon-purified T lymphocytes isolated either from natural knockout mice for *Art2a* (C57BL/6) or *Art2b* (NZW) or from mice expressing *Art2a* and *Art2b* (BALB/c and B6NWF₁) were incubated with [³²P]NAD for 1 h. Crude cell lysates were then prepared, and labeled proteins were analyzed by autoradiography after SDS-PAGE. As illustrated in Fig. 9A (lane 2), strong ADP-ribosylation of several proteins was routinely ob-

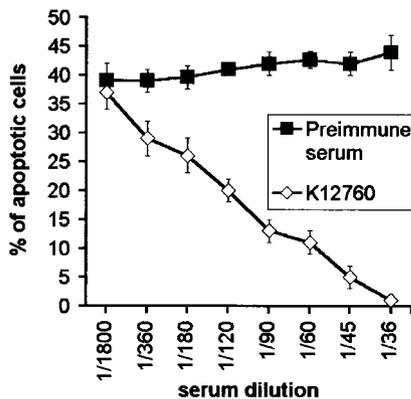


FIGURE 8. Apoptosis induced by NAD is inhibited in the presence of an ART2.2-specific antiserum. Purified T cells from B6NWF₁ mice were incubated with a serial dilution of the ART2.2-specific antiserum K12760 or with the corresponding preimmune serum for 30 min at 4°C and then incubated for 30 min with 5 μM NAD before quantification of apoptotic cells by annexin V/PI staining. Each point corresponds to the mean of three independent experiments. Vertical bars represent SD.

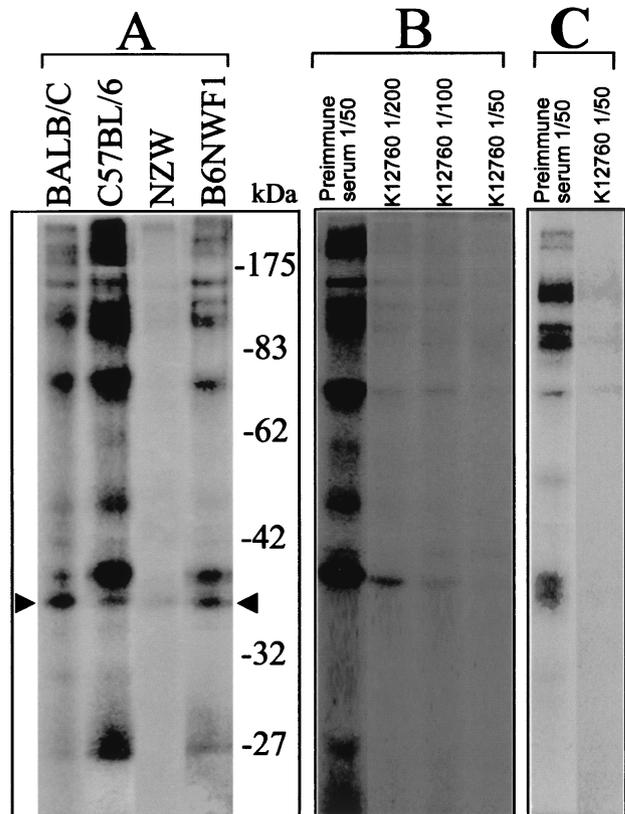


FIGURE 9. ADP-ribosylation of proteins on T cells from different mice. A, Nylon-purified T cells were labeled with [³²P]NAD for 60 min, and crude cell lysates from 1 × 10⁶ cells per lane were analyzed by SDS-PAGE. Dried gels were exposed to x-ray films for 4 days. Typical results from three independent experiments are presented. Arrows mark the position of a differentially labeled 35-kDa protein. B and C, Cells from C57BL/6 (B) or B6NWF₁ (C) mice were treated as in A, but cells were preincubated before [³²P]NAD labeling at 4°C for 30 min with ART2.2-specific antiserum K12760 or preimmune serum at the indicated dilutions.

served with cells from C57BL/6 mice, consistent with their high level of ART2.2 expression (22). The pattern of proteins labeled was very similar to that already reported by Okamoto et al. in these mice (17). A similar pattern of bands was observed also in cells from BALB/c and B6NWF₁ animals (Fig. 9A, lanes 1 and 4), although the intensity of labeling was lower than in T cells from C57BL/6 mice. In marked contrast, little if any ADP-ribosylated cell surface proteins were detected on cells from ART2.2-deficient NZW mice (Fig. 9A, lane 3). Preincubation of T cells with ART2-specific antisera K12760 (Fig. 9, B and C) or R8 (data not shown) reduced labeling of cell surface proteins to background levels in all strains tested. These findings confirmed that most if not all of the ART activity on resting murine T lymphocytes can be attributed to the ART2 ADP ribosyltransferase.

Taken together, these results further suggest that resistance of NZW T cells to NAD-mediated apoptosis can be attributed to the virtual absence of cell surface ADP-ribosyltransferase activity on these cells. Similarly, T cells with strong cell surface ART activity, e.g., those of BALB/c and B6NWF₁ mice, can be rendered resistant to NAD-mediated apoptosis by inhibiting ART activity with ART2-specific Abs. In contrast, resistance of C57BL/6 T cells to NAD-mediated apoptosis cannot be attributed to lack of ADP-ribosyltransferase activity. Instead, it seems most likely that these cells carry a defect in a downstream effector of ART activity.

Discussion

Increasing evidence suggests that extracellular NAD can regulate T cell functions via cell surface GPI-anchored ADP-ribosyltransferases (6). Our results demonstrate that extracellular NAD strongly inhibits the proliferation of normal splenic T cells from BALB/c, C57BL/6, or B6NWF₁ mice, at doses ranging from 1 to 10 μ M (Fig. 2). This is consistent with previous studies reporting an inhibitory effect of NAD on the proliferation of CTL lines and of naive peripheral T cells (15–17). Yet, more importantly, we demonstrate here that extracellular NAD has a direct toxic effect on T cells from BALB/c mice and induces programmed cell death in the absence of any additional cosignal (Fig. 4). This contrasts with the situation in ART2.1-deficient C57BL/6 mice, in which NAD blocks T cell activation but does not induce apoptosis (17), and in ART2.2-deficient NZW mice, which are refractory to both NAD-mediated apoptosis and inhibition of T cell proliferation.

It has previously been shown that the suppressive effects of ecto-NAD on T cells of C57BL/6 mice depend on GPI-anchored ART(s) (15). Similarly, we demonstrate that removal of GPI-anchored cell surface proteins by treatment of BALB/c T cells with bacterial PI-PLC strongly reduces their susceptibility to NAD-induced apoptosis (Fig. 5B). Implication of ART(s) rather than other NAD-metabolizing ectoenzymes such as CD38 or PC-1 (29, 30) is also attested by the observation that none of the NAD metabolites tested can mediate apoptosis (Fig. 5A), that cells undergoing apoptosis are ART2.2⁺ (Fig. 7), and that apoptosis can be inhibited by polyclonal Abs to ART2.2 (Fig. 8).

In mice, at least six distinct GPI-anchored ARTs, namely ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4, and ART5, have been identified that could be involved in the apoptotic process (3, 4, 18, 19). ART1 has been cloned by different groups from mouse lymphoma cells (Yac-1), from a BALB/c skeletal muscle cDNA library, or from mouse genomic DNA. Northern blot and RT-PCR analyses previously reported indicate that *Art1* is prominently expressed in cardiac and skeletal muscles and at much lower level in lymphoid tissues (12, 20, 21). Although ART1 has been detected in T cell lymphomas and hybridomas, direct evidence was still lacking for its expression on normal peripheral T lymphocytes. Our attempt to detect ART1 by RT-PCR on naive splenic T cells was negative even by using different pairs of specific primers and irrespective of the mouse strain tested (Fig. 1). It can thus be concluded that *Art1* is not expressed on normal T lymphocytes. Weak signals detected by others for *Art1* expression in lymphoid organs may be due to its expression on other cell types (35). Alternatively, *Art1* expression may be developmentally regulated and limited to fully differentiated T cells like activated CTL or to transformed T cell lymphomas (20). A rather similar situation has been reported for ART5, which was isolated from Yac-1 lymphoma cells but, again, is not expressed on normal lymphoid spleen cells (18). In contrast, our results confirm previous observations (9, 22, 24) that *Art2a* and *Art2b* transcripts are found in resting BALB/c T cells (Fig. 1). In C57BL/6 mice, a low level of *Art2a* transcripts is detected, but this mRNA contains a stop codon that prevents the expression of a functional enzyme (23). Moreover, our finding that ART2-specific antisera abolish labeling of cell surface proteins following incubation with [³²P]NAD (Fig. 9) supports the conclusion that the ART2s represent the predominant ARTs expressed on normal peripheral T cells. It further implies that ART2.2, and presumably also ART2.1, can ADP-ribosylate a number of different cell surface proteins.

The very high sensitivity of T cells from B6NWF₁ animals to NAD-induced apoptosis, whereas T cells of either parental animal are resistant (Fig. 4), is important because it indicates that comple-

mentation of (at least) two genetic factors is operative in cells of the F₁ animals in NAD-mediated apoptosis. We propose that one of these is ART2 cell surface ADP-ribosyltransferase activity. This hypothesis is supported by our findings that ART2-specific antisera block both ADP-ribosylation of cell surface proteins (Fig. 9) and NAD-mediated apoptosis of B6NWF₁ cells (Fig. 8). It is further supported by our finding that cells from ART2.1/ART2.2 double-knockout mice are completely resistant to NAD-mediated apoptosis (our unpublished observations). The resistance of NZW T cells to NAD-induced apoptosis (Fig. 4), then, could be attributed to the virtual absence of ART activity on these cells (Fig. 9). Consistent with this interpretation, we find that treatment of NZW T cells with DTT, which is known to stimulate the activity of ART2.1 (13), enhances both NAD-mediated ADP-ribosylation of cell surface proteins and apoptosis (our unpublished observations).

We propose that the second genetic factor governing sensitivity to rapid NAD-mediated apoptosis of resting T cells in B6NWF₁ animals concerns a downstream effector of ADP-ribosylation. The observation that C57BL/6 T cells are resistant to NAD-mediated apoptosis (Fig. 4) despite a high level of cell surface ART activity (Fig. 9) implies that ART activity alone is not sufficient for mediating apoptosis. We hypothesize that C57BL/6 mice are resistant to NAD-mediated apoptosis due to a defect in a downstream effector of ADP-ribosylation and that this defect is complemented in B6NWF₁ animals by the corresponding factor from the NZW parent. Further analyses are required to determine whether this factor is itself a target protein for ADP-ribosylation or a signaling component activated by ART activity. In this context, it may be interesting to note that lysates of BALB/c and B6NWF₁ T cells contain a prominent 35-kDa protein that is labeled weakly in lysates of C57BL/6 mice (arrows in Fig. 9A).

The molecular mechanisms underlying rapid NAD-mediated apoptosis of naive T lymphocytes are still unknown but several hypotheses can be put forward. Activation of the caspase pathway is a well-established mechanism for inducing apoptosis of T cells. However, preliminary evidence using caspase inhibitors indicate that NAD does not activate this pathway in resting T cells. Signaling through GPI-anchored proteins has been reported in diverse settings (36). One could thus postulate that ART2.2 itself, as a GPI-anchored protein, would deliver the apoptotic signal to naive T cells. This possibility is supported by the observation that RT6 is associated with tyrosine kinases and could thereby, potentially, generate intracellular signaling (37). Alternatively, a membrane protein distinct from ART might be involved in apoptotic signal delivery. For example, the apoptotic signal could be delivered via ADP-ribosylation of important costimulatory signaling cell surface molecules. Indeed, CD45, CD44, CD43, or CD27 have been shown to be ADP-ribosylated on NAD-treated T cells (17). Conceivably, this could result in inappropriate weak stimulation signals that in turn would cause programmed cell death. It is indeed established that costimulatory molecules are associated with protein kinases involved in signal transduction (38). Such weak stimulatory signals have been shown to induce apoptosis at different stages during lymphocyte differentiation (39). However, our results indicate that strong stimulation of cells with mitogenic activators fails to rescue cells from death (Fig. 2). Recently, an additional mechanism involving CD38 has been proposed to mediate apoptosis of activated T cells (40). Indeed, ADP-ribosylation of CD38, by blocking its cyclase activity and cADPR production, was shown to induce apoptosis in T cells recently activated by soluble CD3 mAb (40). However, our results indicate that resting T cells lacking CD38 are sensitive to NAD-induced apoptosis whereas CD38-expressing cells are resistant (Fig. 6). Conceivably,

the apoptotic mechanisms induced by NAD may differ in activated and nonactivated T cells.

Next to the remarkable rapid induction of apoptosis of resting T cells described here, NAD evidently influences T cell functions in other ways. This is supported by the finding that C57BL/6 mice are resistant to rapid induction of apoptosis (Fig. 4), but are sensitive to NAD-mediated inhibition of proliferation (Fig. 2). Given that several different proteins are ADP-ribosylated following treatment of cells with ecto-NAD (Fig. 9), it is not surprising that ecto-NAD affects T cell functions in more than one way. As shown by Dennert and coworkers, ADP-ribosylation of various membrane proteins affect T cell signaling and functions via ADP-ribosylation of important cell surface molecules including CD8 coreceptors and LFA-1 (16, 17, 41). This inhibitory effect of NAD is consistent with the demonstration that transfection of EL4 T lymphoma cells with *Art1* results in failure of TCR and coreceptors to associate into a functional macromolecular complex in the presence of ecto-NAD as a consequence of ADP-ribosylation (28).

Under physiological conditions, the concentration of NAD in extracellular body fluids is low, but it can increase in injured tissues due to the liberation of their intracellular content by dead cells. On the basis of our findings, it is tempting to speculate that NAD would then kill naive T cells present in these tissues or block their recruitment by nonprofessional APC. In contrast, recently activated, i.e., Ag-specific T cells, that have shed ART2 (14) would be resistant to the apoptotic effects of ecto-NAD. NAD-mediated apoptosis could thereby play a role in restricting the proliferation of bystander lymphocytes. This provides a plausible scheme for NAD to participate in the control of autoimmunity as already suggested by ART deficiency in mice and rats prone to autoimmune diseases (8, 24, 25).

Acknowledgments

We thank F. Fudalej, C. Joulin, M. Nissen, and C. Thenevin for expert technical assistance and Dr. E. H. Leiter for critical review of the manuscript.

References

- Ludden, P. W. 1994. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* 138:123.
- Moss, J., and M. Vaughan. 1990. *ADP-Ribosylating Toxins and G Proteins: Insights into Signal Transduction*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Koch-Nolte, F., and F. Haag. 1997. Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues: emerging gene families. *Adv. Exp. Med. Biol.* 419:1.
- Haag, F., and F. Koch-Nolte. 1997. The vertebrate gene family of mono(ADP-ribosyl)transferases: proposal for a unified nomenclature. *Adv. Exp. Med. Biol.* 419:459.
- Okazaki, I. J., and J. Moss. 1998. Glycosylphosphatidylinositol-anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 273:23617.
- Haag, F., and F. Koch-Nolte. 1998. Endogenous relatives of ADP-ribosylating bacterial toxins in mice and men: potential regulators of immune cell function. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 12:53.
- Bortell, R., T. Kanaitzuka, L. A. Stevens, J. Moss, J. P. Mordes, A. A. Rossini, and D. L. Greiner. 1999. The RT6 (Art2) family of ADP-ribosyltransferases in rat and mouse. *Mol. Cell. Biochem.* 193:61.
- Greiner, D. L., S. Malkani, T. Kanaitzuka, R. Bortell, J. Doukas, M. Rigby, B. Whalen, L. A. Stevens, J. Moss, J. P. Mordes, and A. A. Rossini. 1997. The T cell marker RT6 in a rat model of autoimmune diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 419:209.
- Prochazka, M., H. R. Gaskins, E. H. Leiter, F. Koch-Nolte, F. Haag, and H. G. Thiele. 1991. Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. *Immunogenetics* 33:152.
- Hollmann, C., F. Haag, M. Schlott, A. Damaske, H. Bertuleit, M. Matthes, M. Kuhl, H. G. Thiele, and F. Koch-Nolte. 1996. Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. *Mol. Immunol.* 33:807.
- Soman, G., A. Haregewoin, R. C. Hom, and R. W. Finberg. 1991. Guanidine group specific ADP-ribosyltransferase in murine cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:301.
- Okazaki, I. J., H. J. Kim, N. G. McElvaney, E. Lesma, and J. Moss. 1996. Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferase from lymphocytes. *Blood* 88:915.
- Hara, N., M. Badruzzaman, T. Sugae, M. Shimoyama, and M. Tsuchia. 1999. Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 259:289.
- Kahl, S., M. Nissen, R. Girsich, T. Duffy, E. H. Leiter, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2000. Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J. Immunol.* 165:4463.
- Wang, J., E. Nemoto, A. Y. Kots, H. R. Kaslow, and G. Dennert. 1994. Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Immunol.* 153:4048.
- Wang, J., E. Nemoto, and G. Dennert. 1996. Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56^{lck}-associated protein. *J. Immunol.* 156:2819.
- Okamoto, S., O. Azhpa, Y. Yu, E. Russo, and G. Dennert. 1998. Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J. Immunol.* 160:4190.
- Okazaki, I. J., H. J. Kim, and J. Moss. 1996. Cloning and characterization of a novel membrane-associated lymphocyte NAD:arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 271:22052.
- Koch-Nolte, F., F. Haag, R. Braren, M. Kuhl, J. Hoovers, S. Balasubramanian, F. Bazan, and H. G. Thiele. 1997. Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins. *Genomics* 39:370.
- Yu, Y., S. Okamoto, E. Nemoto, and G. Dennert. 1997. Molecular cloning of a novel murine arginine-specific mono-ADP-ribosyltransferase and its expression in lymphoid cells. *DNA Cell Biol.* 16:235.
- Braren, R., G. Glowacki, M. Nissen, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 1998. Molecular characterization and expression of the gene for mouse NAD⁺:arginine ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase, *Art1*. *Biochem. J.* 336:561.
- Koch-Nolte, F., T. Duffy, M. Nissen, S. Kahl, N. Killen, V. Ablamunits, F. Haag, and E. H. Leiter. 1999. A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J. Immunol.* 163:6014.
- Kanaitzuka, T., R. Bortell, L. A. Stevens, J. Moss, D. Sardinha, T. V. Rajan, D. Zipris, J. P. Mordes, D. L. Greiner, and A. A. Rossini. 1997. Expression in BALB/c and C57BL/6 mice of Rt6-1 and Rt6-2 ADP-ribosyltransferases that differ in enzymatic activity: C57BL/6 Rt6-1 is a natural transgene knockout. *J. Immunol.* 159:2741.
- Koch-Nolte, F., J. Klein, C. Hollmann, M. Kuhl, F. Haag, R. Gaskins, E. H. Leiter, and H. G. Thiele. 1995. Defects in the structure and expression of the genes for the T cell marker Rt6 in NZW and (NZB × NZW)F₁ mice. *Int. Immunol.* 7:883.
- Cetkovic-Cvrlje, M., S. D. Yang, and E. H. Leiter. 1997. Mono(ADP-ribosyl)transferase genes and diabetes in NOD mice: is there a relationship? *Adv. Exp. Med. Biol.* 419:217.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J. Immunol. Methods* 184:39.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S. A. Ben-Sasson. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493.
- Liu, Z. X., Y. Yu, and G. Dennert. 1999. A cell surface ADP-ribosyltransferase modulates T cell receptor association and signaling. *J. Biol. Chem.* 274:17399.
- Deterre, P., V. Berthelot, B. Bauvois, A. Dalloul, F. Schuber, and F. Lund. 2000. CD38 in T- and B-cell functions. *Chem. Immunol.* 75:146.
- Goding, J. W., R. Terkeltaub, M. Maurice, P. Deterre, A. Sali, S. I. Belli. 1998. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol. Rev.* 161:11.
- Chow, S. C., G. E. Kass, and S. Orrenius. 1997. Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36:1149.
- Ralevic, V., and G. Burnstock. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50:413.
- Ralevic, V., C. H. Hoyle, and G. Burnstock. 1995. Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. *J. Physiol.* 483:703.
- Lund, F. E., D. A. Cockayne, T. D. Randall, N. Solvason, F. Schuber, and M. C. Howard. 1998. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol. Rev.* 161:79.
- Kefalas, P., B. Saxty, M. Yadollahi-Farsani, and J. MacDermot. 1999. Chemotaxin-dependent translocation of immunoreactive ADP-ribosyltransferase-1 to the surface of human neutrophil polymorphs. *Eur. J. Biochem.* 259:866.
- Marmor, M. D., and M. Julius. 2000. The function of GPI-anchored proteins in T cell development, activation and regulation of homeostasis. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 14:99.
- Rigby, M. R., R. Bortell, D. L. Greiner, M. P. Czech, J. K. Klarlund, J. P. Mordes, and A. A. Rossini. 1996. The rat T-cell surface protein RT6 is associated with src family tyrosine kinases and generates an activation signal. *Diabetes* 45:1419.
- Hardy, K., and G. Chaudhri. 1997. Activation and signal transduction via mitogen-activated protein (MAP) kinases in T lymphocytes. *Immunol. Cell. Biol.* 75:528.
- Musci, M. A., K. M. Latinis, and G. A. Koretzky. 1997. Signaling events in T lymphocytes leading to cellular activation or programmed cell death. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83:205.
- Han, M. K., Y. S. Cho, Y. S. Kim, C. Y. Yim, and U. H. Kim. 2000. Interaction of two classes of ADP-ribose transfer reactions in immune signaling. *J. Biol. Chem.* 275:20799.
- Nemoto, E., Y. Yu, and G. Dennert. 1996. Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J. Immunol.* 157:3341.

ARTICLE 2

Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X₇ Receptor¹

Sahil Adriouch,* Claudia Dox,[†] Vivienne Welge,[†] Michel Seman,* Friedrich Koch-Nolte,[†] and Friedrich Haag^{2,†}

The P2X₇ receptor (P2X₇R) is an ATP-gated channel that mediates apoptosis of cells of the immune system. The capacity of P2X₇R to form large pores depends on its large cytoplasmic tail, which harbors a putative TNFR-related death domain. Previous transfection studies indicated that mouse P2X₇R forms pores much less efficiently than its counterparts from humans and rats. In this study, we demonstrate that an allelic mutation (P451L) in the predicted death domain of P2X₇R confers a drastically reduced sensitivity to ATP-induced pore formation in cells from some commonly used strains of mice, i.e., C57BL/6 and DBA/2. In contrast, most other strains of mice, including strains derived from wild mice, carry P451 at this position as do rats and humans. The effects of the P451L mutation resemble those of the E496A mutation in human P2X₇R. These P2X₇R mutants may provide useful tools to decipher the molecular mechanisms leading to pore formation. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 4108–4112.

Following their release from the intracellular compartment into the extracellular space, nucleotides such as ATP and NAD profoundly affect the functions of lymphocytes, macrophages, and other cells (1–5). In the immune system, extracellular ATP can permeabilize and cause lysis of lymphocytes and APC, and may provide a CD95- and perforin-independent mechanism of inducing apoptosis (6–9). Prolonged exposure of T cells to ATP induces exposure of phosphatidylserine (PS)³ on the outer leaflet of the plasma membrane, followed by DNA fragmentation and irreversible uptake of propidium iodide (PI; Refs. 7 and 10).

*Université Denis Diderot, Paris France; and [†]Institute of Immunology, University Hospital, Hamburg, Germany

Received for publication June 14, 2002. Accepted for publication August 28, 2002.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant SFB 545/B9 (to F.K.-N. and F.H.). S.A. is a recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Friedrich Haag, Institute of Immunology, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. E-mail address: haag@uke.uni-hamburg.de

³ Abbreviations used in this paper: PS, phosphatidylserine; PI, propidium iodide; P2X₇R, P2X₇ receptor; YO-PRO-1, quinolinium, 4-(3-methyl-2-[³H]-benzoxazolylidene)methyl)-1-(3-(triethylammonio)propyl) diiodide; HEK, human embryonic kidney; bzATP, 2',3'-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP; SH, Src homology; SH3BP, SH3-binding protein; TNFR1-DD, TNFR1-death domain.

ATP can be released into the extracellular compartment by nonlytic mechanisms or as consequence of cell damage in injured tissues or at sites of inflammation (11, 12).

On the basis of its pharmacological properties, the cytolytic actions of ecto-ATP have been ascribed to the P2X₇ receptor (P2X₇R) (13, 14). A number of peculiar features distinguish P2X₇ from other purinergic receptors (10, 15). Whereas other P2X receptors activate at ATP concentrations <50 μM (16), P2X₇R requires levels of ATP in the millimolar range to achieve full activation (13, 14, 17). Moreover, P2X₇R can exist in at least two conductance states (13). Upon brief exposure to ATP, P2X₇R functions as a nonselective cation channel, but upon prolonged exposure, channels rapidly transform into pores allowing passage of solutes up to 800 Da, such as the DNA-staining dye quinolinium, 4-(3-methyl-2-[³H]-benzoxazolylidene)methyl)-1-(3-(triethylammonio)propyl) diiodide (YO-PRO-1). Continuous ligation of P2X₇R can lead to cell death (18, 19).

The molecular mechanisms leading to pore formation upon activation of P2X₇R remain to be defined. Domain-swapping experiments demonstrated that the C-terminal domain, which is significantly larger in P2X₇R than in other P2X receptors, is essential (13, 14). Coimmunoprecipitation experiments suggested that P2X₇R may form larger complexes with several intracellular proteins (20). Interestingly, the C-terminal tail of P2X₇R contains motifs homologous to protein-protein interaction and LPS-binding domains (21). An allelic polymorphism (E496A) in a putative TNFR-related death domain leads to loss of function of human P2X₇R (22, 23).

It is not yet clear whether P2X₇R itself forms pores or induces pore formation by binding to other proteins. Transfection of 293 human embryonic kidney (HEK) cells with human or rat P2X₇R is sufficient to confer ATP-sensitive pore formation (24–27). Intriguingly, transfectants with mouse P2X₇R appeared much less sensitive to ATP, although some in vivo experiments had indicated that mouse T cells, macrophages, and dendritic cells are highly sensitive to ATP (6, 10, 28).

In the context of ongoing investigations on the effects of extracellular nucleotides on T cell functions, we noticed a striking difference in T cell responses to ATP between BALB/c and C57BL/6 mice. In this study, we demonstrate that an allelic polymorphism in the putative death domain of mouse P2X₇R (P451L) markedly impairs its function and accounts for differential strain responses to ATP.

Materials and Methods

Materials

Chemicals were from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany), unless indicated otherwise. YO-PRO-1, Fluo-3, and Pluronic F-127 were from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands).

Animals, cells, and DNA

Mice were from Charles River Breeding Laboratories (Sulzfeld, Germany); genomic DNAs were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). T cells were prepared for flow cytometry as described (3). B cells were depleted by MACS using anti-B220 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). 293HEK cells were from American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Assays for calcium uptake, PS exposure, and pore formation

Calcium uptake was assayed by preincubation of cells with 2 μ M Fluo-3/0.04% Pluronic F-127 for 20 min at room temperature before FACS analysis. Staining with Annexin V^{FITC} (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) and PI was as described previously (3). For assay of YO-PRO-1 uptake, cells were incubated at 37°C with ATP in PBS or sucrose buffer (24), and YO-PRO-1 (1 μ g/ml) was added for the last 2 (PBS) or 10 (sucrose) min before FACS analysis.

Cloning, PCR, and cell transfections

P2X₇R cDNAs were PCR amplified with high-fidelity Platinum Taq polymerase (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) from purified BALB/c or C57BL/6 T cells using P2X7 specific primers described elsewhere (25), and cloned into the pCR4Blunt-Topo vector. Two clones were sequenced completely on both strands (Genome Express, Montreuil, France). The single point mutation was confirmed by direct sequencing of PCR products from two separate PCR using internal primers. For functional expression, cDNAs were subcloned into the pCDNA6/V5-HisB vector (Invitrogen). 293HEK cells (1×10^6) were transfected with 1 μ g of expression construct using FuGENE6 transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany). Stable transfectants were selected with 6 μ g/ml blasticidin. Allele-specific PCR amplification was performed with AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) using allele-specific forward primers 451P-F (CTATCTCTCCAGACTCACCC) or 451L-F (CTATCTCTCCAGACTCACCCCT) in combination with P2X7-R (TATAATCCCGGGAGGATACTTGAAGCCACTGTAC) for 30 cycles (96°C for 30 s, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min). Western blot analysis was performed as described previously (29).

Results and Discussion

Differential sensitivities of T cells from BALB/c and C57BL/6 mice to ATP-induced calcium uptake and PS exposure

Extracellular ATP induces calcium uptake and death by apoptosis in T cells (28). The latter can be assessed by exposure of PS on the outer leaflet of the plasma membrane, and ultimately by failure to exclude PI. T cells from BALB/c and C57BL/6 mice differ markedly in their sensitivity to these effects of ATP (Fig. 1).

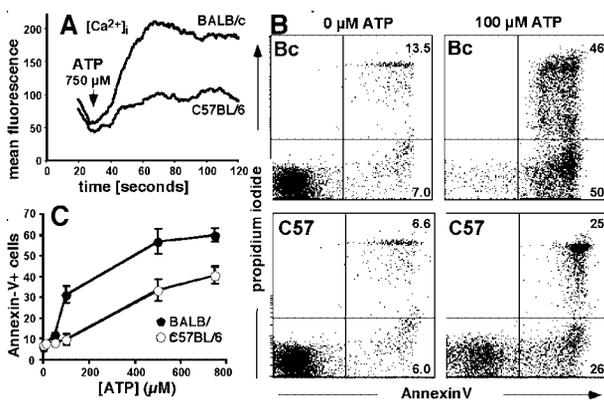


FIGURE 1. BALB/c and C57BL/6 T cells differ in sensitivity to ATP-induced calcium uptake and PS exposure. *A*, Purified splenic T cells from BALB/c and C57BL/6 mice were loaded with the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo-3 and analyzed by flow cytometry. At the indicated time point, cells were treated with ATP. *B*, Cells were incubated for 2 h at 37°C in the presence or absence of ATP and stained with Annexin V^{FITC} and PI. *C*, Cells were incubated for 30 min at 37°C with the indicated concentrations of ATP and stained as in *B*.

ATP-induced PS exposure is mediated by P2X₇R

To determine which purinergic P2 receptor(s) were involved in ATP-mediated PS exposure, the effects of known receptor agonists and antagonists (15, 27) were evaluated. The rank order of sensitivity suggested involvement of P2X₇R, because 2',3'-*O*-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (bzATP), a known P2X₇R agonist, was more efficient than ATP itself, and the effect was blocked by 1-[*N*,*O*-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine and oxidized ATP, known inhibitors of P2X₇R-mediated responses (Fig. 2, *A–C*). As seen in Fig. 1, reactivity was markedly reduced in C57BL/6 T cells. P2X₇R differs from other members of the P2 family by its capacity to induce pores in the cell membrane that are permeable to the DNA-binding dye YO-PRO-1. As observed for ATP-induced PS exposure, bzATP-induced YO-PRO-1 uptake was also reduced in C57BL/6 vs BALB/c T cells (Fig. 2*D*). Collectively, these observations indicate that ATP-induced PS exposure is mediated by P2X₇R, and that P2X₇R function is impaired in C57BL/6 mice.

The P2X₇ receptors of BALB/c and C57BL/6 mice differ in a single amino acid located in the cytoplasmic tail

To examine whether this difference in function reflects a variation in primary structure, full-length P2X₇R cDNAs were PCR amplified and sequenced from both BALB/c and C57BL/6 mice. A single coding mutation (T1352C) was found in the C57BL/6 allele, resulting in a change from proline to leucine at position 451 (P451L) of the deduced amino acid sequence (Fig. 3*A*, arrow). Sequence alignment showed that the BALB/c allele is in accord with the rat and human orthologs at this position, while the only mouse P2X₇R sequence in the databases (NM_011027) shares the

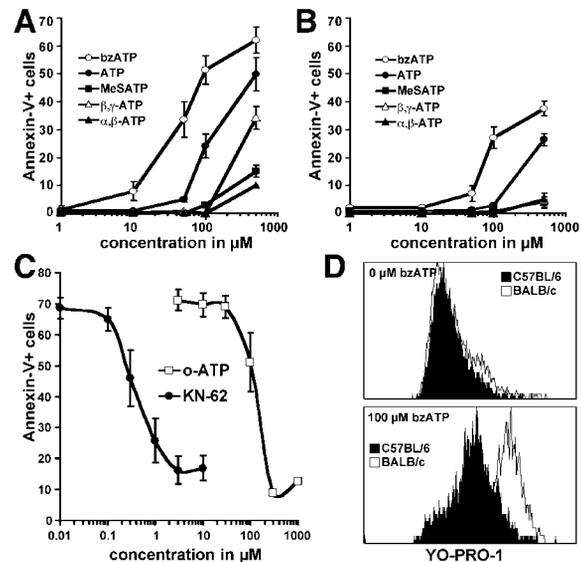


FIGURE 2. ATP-mediated PS exposure is mediated by P2X₇R. Purified splenic T cells from BALB/c (*A*) and C57BL/6 (*B*) mice were incubated for 30 min at 37°C with P2 receptor agonists and analyzed as in Fig. 1*B*. *C*, Purified BALB/c T cells were treated for 2 h at 37°C with the indicated P2 receptor antagonists before treatment with 500 μ M ATP. *D*, BALB/c and C57BL/6 mice differ in sensitivity to ATP-induced dye uptake. Purified lymph node T cells from BALB/c (open histograms) and C57BL/6 (filled histograms) mice were incubated for 10 min in the absence (*top panel*) or presence (*bottom panel*) of 100 μ M bzATP. The DNA-staining dye YO-PRO-1 was added for the last 2 min before FACS analysis. β , γ -ATP, β , γ -methylene-ATP; α , β -ATP, α , β -methylene-ATP; MeSATP, 2-methylthio-ATP; KN-62, 1-[*N*,*O*-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine; o-ATP, oxidized ATP.

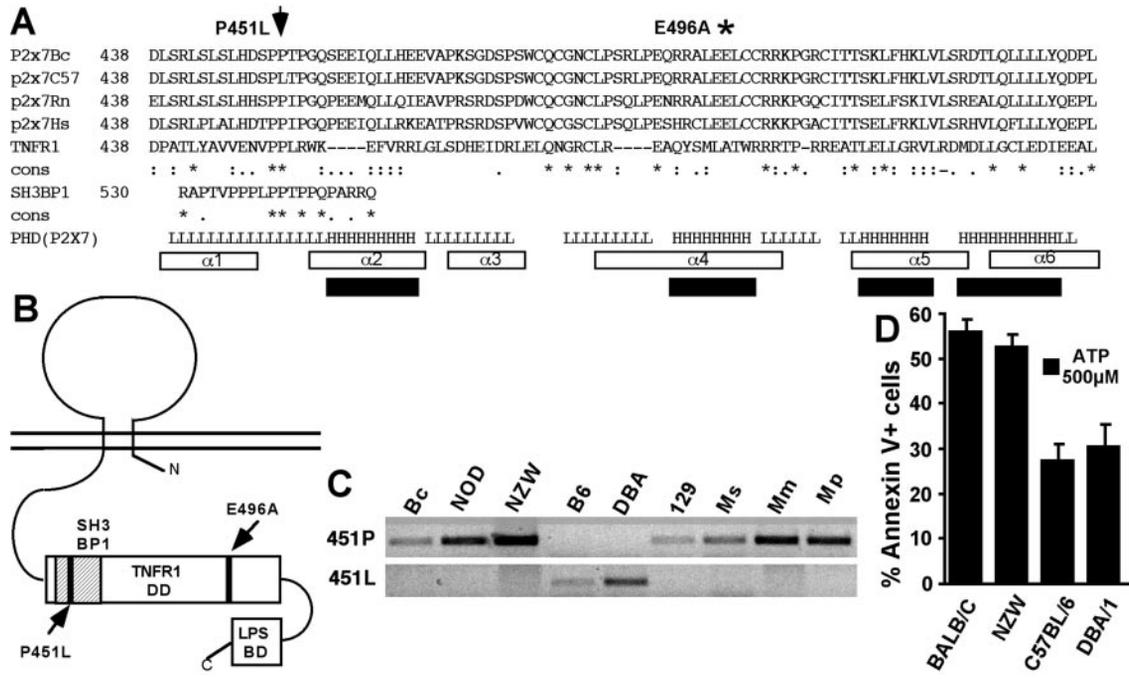


FIGURE 3. BALB/c and C57BL/6 mice differ in a single amino acid residue in the P2X₇R C-terminal cytoplasmic domain. **A**, Alignment of a fragment of the P2X₇R cytoplasmic tail with fragments of TNFR1 and SH3BP1 (21). The P451L mutation is indicated by an arrow, the E496A mutation found in chronic lymphocytic leukemia patients (22) by an asterisk. Conserved residues (*), conserved (:), and semiconserved (.) substitutions of P2X₇R to TNFR1 and SH3BP1 are indicated below the respective sequences. The six α helices of the TNFR1-DD (34) are indicated by □. α -Helical domains of the P2X₇R cytoplasmic tail were predicted using the profile network from Heidelberg (PHD) algorithm (35) based on an alignment of mouse, rat, and human P2X₇R, and are shown as ■. Predictions for residues with an expected accuracy >82% are indicated by H for “helical” and L for “loop”. **B**, Schematic diagram of P2X₇R, showing the P451L and E496A mutations and regions of similarity with TNFR1, SH3BP1, and a putative LPS-binding domain (21). **C**, Distribution of the P451L mutation among inbred mouse strains. DNA from the indicated strains was PCR amplified using primers specific for the 451P or L alleles. **D**, ATP-induced PS exposure is reduced in mice carrying the 451L allele. Purified splenic T cells from the indicated mouse strains were incubated with 500 μ M ATP and analyzed for annexin V binding as in Fig. 1B. NOD, nonobese diabetic; NZW, New Zealand White.

P451L mutation with the C57BL/6 allele (not shown). Interestingly, this mutation lies within a region of the C-terminal cytoplasmic domain showing homology to the TNFR1-death domain (TNFR1-DD) and to a fragment of the Src homology (SH)3-binding protein (SH3BP) 1 (Ref. 21; Fig. 3).

To determine the distribution of the two alleles among laboratory mice, mouse genomic DNAs were analyzed by PCR amplification using primers designed to specifically recognize each of the variants. Of the 14 specimens analyzed, only DNA from C57BL/6, C57BL/10, DBA/1, and DBA/2 mice carried the 451L allele. All other mice analyzed, including four strains derived from wild mice (*Mus caroli*, *Mus spretus*, *Mus musculus*, *Mus poschiavinus*), carried the 451P allele (Fig. 3C and not shown). Thus, it is likely that 451P represents the wild type within the mouse population.

Analysis of T cells from DBA/1 mice, a second strain carrying the P451L mutation, showed reduced ATP-induced PS exposure in this strain also, confirming the association of P2X₇R function with the genotype at this locus (Fig. 3D).

To determine whether the P451L mutation is the cause for the observed differences in P2X₇R function, HEK cells were transfected with cDNAs encoding the two variants. Though lack of reagents precluded surface staining, Western blot analysis showed comparable expression of both variants (Fig. 4A). ATP-induced YO-PRO-1 uptake, PS exposure, and calcium influx were stronger in cells transfected with the 451P allele than in their 451L counterparts (Figs. 4, B–F). Because the two cDNAs differ in a single coding mutation, these experiments conclusively show that the

P451L substitution severely affects the function of P2X₇R as cation channel and macropore.

The C-terminal cytoplasmic domain of the P2X₇R protein is known to be important for receptor function. Deletion of this domain abolished pore-forming and lytic activities of the receptor (13). In humans, a severely impairing mutation (E496A) has been observed within this region (22). The frequency of E496A is elevated among individuals suffering from chronic lymphocytic leukemia, and the mutation is thought to contribute to disease pathogenesis by interfering with apoptosis in B lymphocytes (23). Like E496A, P451L also maps to a region of the cytoplasmic tail that shows homology to the TNFR1-DD (21). Secondary structure prediction algorithms predict this region, like TNFR1-DD, to be primarily α -helical (Fig. 3A). P451L, in addition, lies within an area of homology to the SH3BP1 (21), and thus may interfere with the interaction of P2X₇R with an SH3-domain-containing protein. Intriguingly, alignment with the corresponding regions of TNFR1 and SH3BP1 shows that the proline at position 451 is conserved in all proteins with the exception of C57BL/6 P2X₇R (Fig. 3A). Because P2X₇R exists in the membrane in a complex with multiple other proteins (20), it is tempting to speculate that the P451L mutation affects the capacity of the receptor to interact with other proteins.

Our findings have implications also for the evaluation of previous studies concerning mouse P2X₇R. Transfection studies showed that mouse P2X₇R is much less sensitive to ATP than its rat or human orthologs (17, 26). This may be explained by the presence of the P451L mutation in the NM_011027 cDNA used

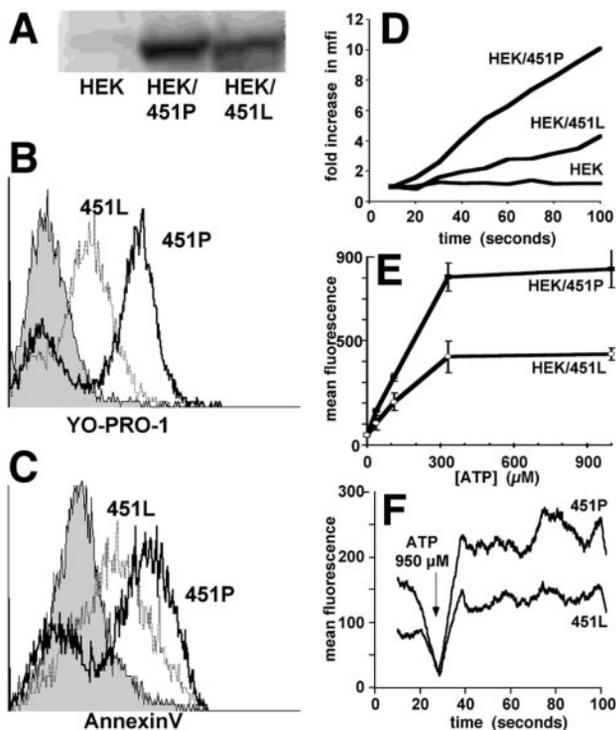


FIGURE 4. The P451L mutation impairs P2X₇-R function. *A*, Western blot analysis of P2X₇-R expression in HEK cells and subclones stably transfected with the 451P or 451L P2X₇-R alleles. *B*, ATP-induced pore formation is reduced in cells carrying the 451L allele. Transfected HEK cells were incubated with YO-PRO-1 and 1 mM ATP for 2 min and analyzed by flow cytometry. Shaded histograms represent parental 293HEK cells. *C*, ATP-induced PS exposure is reduced in cells carrying the 451L allele. Transfected HEK cells were incubated with Annexin V^{FITC} and 1 mM ATP for 5 min, and were analyzed by flow cytometry. Shaded histograms represent parental 293HEK cells. *D*, Kinetics of dye uptake by HEK 451L and 451P transfectants. Cells were incubated with YO-PRO-1, and baseline fluorescence was determined in a flow cytometer. The increase in mean fluorescence intensity relative to baseline following addition of 1 mM ATP is shown. *E*, Dose response to ATP of HEK transfectants. Uptake of YO-PRO-1 by transfected HEK cells (eight independent clones bearing the 451P and four bearing the 451L allele) was determined in sucrose buffer (24). *F*, Calcium uptake by HEK 451L and 451P transfectants. Calcium uptake was measured in HEK transfectants as in Fig. 1.

for transfection. Our findings also bear relevance for studies using P2X₇-R-deficient mice (30–32). In some of these, the P2X₇-R^{-/-} phenotype may have been underestimated because it was analyzed against genetic backgrounds (C57BL/6 or DBA/2) already carrying a naturally defective variant.

In conclusion, our findings provide a second example of a naturally occurring point mutation within the P2X₇-R cytoplasmic domain that severely impairs important functions of this receptor, namely pore formation and reorganization of the plasma membrane. Both of these are likely crucial steps involved in biological responses mediated by this receptor such as the induction of apoptosis and cytokine secretion (33). The occurrence of the P451L mutation within a region of similarity to both the TNFR-death domain and an SH3-binding domain supports the notion that these observed homologies may be of functional significance. The further analysis of this mutation thus may provide important insights into the molecular mechanisms of P2X₇-R action.

Acknowledgments

We thank S. Pechberly, G. Dubberke, D. Freese, and W. Ohlrogge for excellent assistance.

References

- Gordon, J. L. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233:309.
- Goding, J. W., and M. C. Howard. 1998. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol. Rev.* 161:5.
- Adriouch, S., W. Ohlrogge, F. Haag, F. Koch-Nolte, and M. Seman. 2001. Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. *J. Immunol.* 167:196.
- Kichenin, K., S. Decollogne, J. Angignard, and M. Seman. 2000. Cardiovascular and pulmonary response to oral administration of ATP in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 88:1962.
- Kichenin, K., and M. Seman. 2000. Chronic oral administration of ATP modulates nucleoside transport and purine metabolism in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:126.
- Buisman, H. P., T. H. Steinberg, J. Fischberg, S. C. Silverstein, S. A. Vogelzang, C. Ince, D. L. Ypey, and P. C. Leijh. 1988. Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7988.
- Di Virgilio, F., P. Pizzo, P. Zanovello, V. Bronte, and D. Collavo. 1990. Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 11:274.
- Filippini, A., R. E. Taffs, and M. V. Sitkovsky. 1990. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8267.
- Blanchard, D. K., S. Wei, C. Duan, F. Pericle, J. I. Diaz, and J. Y. Djeu. 1995. Role of extracellular adenosine triphosphate in the cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of antigen presenting cells. *Blood* 85:3173.
- Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J. M. Sanz, A. Morelli, J. Kang, C. C. Naus, and M. Nedergaard. 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15735.
- Jiang, Q., D. Mak, S. Devidas, E. M. Schwiebert, A. Bragin, Y. Zhang, W. R. Skach, W. B. Guggino, J. K. Foskett, and J. F. Engelhardt. 1998. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor. *J. Cell Biol.* 143:645.
- Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, and G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science* 272:735.
- Rassendren, F., G. N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. A. North, and A. Surprenant. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇: cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* 272:5482.
- Abbracchio, M. P., and G. Burnstock. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64:445.
- Greenberg, S., F. Di Virgilio, T. H. Steinberg, and S. C. Silverstein. 1988. Extracellular nucleotides mediate Ca²⁺ fluxes in J774 macrophages by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 263:10337.
- Hibell, A. D., E. J. Kidd, I. P. Chessell, P. P. Humphrey, and A. D. Michel. 2000. Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 130:167.
- Di Virgilio, F. 1995. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today* 16:524.
- Ferrari, D., M. Los, M. K. Bauer, P. Vandenebeele, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. 1999. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447:71.
- Kim, M., L. H. Jiang, H. L. Wilson, R. A. North, and A. Surprenant. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *EMBO J.* 20:6347.
- Denlinger, L. C., P. L. Fiset, J. A. Sommer, J. J. Watters, U. Prabhu, G. R. Dubyak, R. A. Proctor, and P. J. Bertics. 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.
- Gu, B. J., W. Zhang, R. A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J. A. Barden, and J. S. Wiley. 2001. A Glu⁴⁹⁶ to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X₇ receptor. *J. Biol. Chem.* 276:11135.
- Wiley, J. S., L. P. Dao-Ung, B. J. Gu, R. Sluyter, A. N. Shemon, C. Li, J. Taper, J. Gallo, and A. Manoharan. 2002. A loss-of-function polymorphism mutation in the cytolytic P2X₇ receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 359:1114.
- Hibell, A. D., K. M. Thompson, M. Xing, P. P. Humphrey, and A. D. Michel. 2001. Complexities of measuring antagonist potency at P2X₇ receptor orthologs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296:947.
- Chessell, I. P., J. Simon, A. D. Hibell, A. D. Michel, E. A. Barnard, and P. P. Humphrey. 1998. Cloning and functional characterisation of the mouse P2X₇ receptor. *FEBS Lett.* 439:26.

26. Hibell, A. D., K. M. Thompson, J. Simon, M. Xing, P. P. Humphrey, and A. D. Michel. 2001. Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X₇ receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363:639.
27. North, R. A., and A. Surprenant. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:563.
28. Di Virgilio, F., V. Bronte, D. Collavo, and P. Zanovello. 1989. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP): lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J. Immunol.* 143:1955.
29. Kahl, S., M. Nissen, R. Girisch, T. Duffy, E. H. Leiter, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2000. Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J. Immunol.* 165:4463.
30. Sikora, A., J. Liu, C. Brosnan, G. Buell, I. Chessel, and B. R. Bloom. 1999. Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X₇-independent mechanism. *J. Immunol.* 163:558.
31. Solle, M., J. Labasi, D. G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. H. Koller, R. J. Griffiths, and C. A. Gabel. 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J. Biol. Chem.* 276:125.
32. Labasi, J. M., N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M. M. Payette, W. Brissette, J. R. Wicks, L. Audoly, and C. A. Gabel. 2002. Absence of the P2X₇ receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J. Immunol.* 168:6436.
33. Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O. R. Baricordi, and F. Di Virgilio. 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 β release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* 159:1451.
34. Sukits, S. F., L. L. Lin, S. Hsu, K. Malakian, R. Powers, and G. Y. Xu. 2001. Solution structure of the tumor necrosis factor receptor-1 death domain. *J. Mol. Biol.* 310:895.
35. Rost, B., and C. Sander. 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232:584.

ARTICLE 3

**NAD-induced T cell death:
cell surface ADP-ribosylation by ART2.2 activates
the cytolytic P2X7 receptor**

running title: NAD-induced cell death

Michel Seman¹, Sahil Adriouch¹, Felix Scheuplein², Dunja Freese², Christian Krebs²,
Friedrich Haag², and Friedrich Koch-Nolte^{2*}

¹Université Denis Diderot, F-75251 Paris, France

²Institute of Immunology, University Hospital, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg,
Germany

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: nolte@uke.uni-hamburg.de

Phone: +49/40/42803 3612, FAX: +49/40/42803 4243

Summary

T cells express a toxin-related ADP-ribosylating ecto-enzyme, ART2.2. Exposure of T cells to NAD, the substrate for ADP-ribosylation, induces cell death. ART2.2-catalyzed cell surface protein ADP-ribosylation activates the cytolytic P2X7 purinoreceptor, causing calcium flux, pore formation, phosphatidylserine exposure, and propidium iodide uptake. Interestingly, much lower NAD than ATP concentrations are required to activate P2X7. NAD-induced cell death (NICD) operates with endogenous sources of NAD released during inflammation and tissue injury. These findings identify P2X7 as a key effector of NICD and provide the first convincing demonstration of P2X7 activation by an endogenous ligand. Our results delineate a new mechanism for inducing T cell death and set an interesting precedent for immunoregulation via crosstalk between NAD-dependent ADP-ribosyltransferases and purinoreceptors.

Introduction

The maintenance of homeostasis in the immune system and the focusing of immune reactions on appropriate targets require the coordinated interplay of regulatory mechanisms. Programmed cell death plays a major role in many phases of the immune response (Van Parijs and Abbas, 1998). Impairments in cell death signaling pathways can lead to autoimmune and lymphoproliferative diseases. In the course of evolution, multiple mechanisms of eliciting cell death have developed within the immune system that greatly enhance its flexibility to respond adequately to increasing challenges (Leist and Jaattela, 2001). Death pathways in the immune system include withdrawal of survival factors as well as triggering of so-called "death receptors", such as Fas and other members of the TNF receptor family (Krammer, 2000). Here we delineate a new mechanism for inducing T cell death by extracellular NAD released from injured cells or during inflammation.

Beyond their central roles in energy metabolism, ATP and NAD also play multifaceted roles as second messengers in the extracellular environment where they act as substrates and ligands for diverse ectoenzymes and receptors. These nucleotides can be released from cells by lytic and nonlytic mechanisms into the extracellular environment (Bruzzone et al., 2001; Contreras et al., 2002), where they interact with specific receptors (e.g., P1 and P2 purinoreceptors) and/or are degraded hydrolytically by membrane-bound and secretory ectoenzymes including NADases, ATPases, and phosphodiesterases (e.g. CD38, CD39, and CD203) (Goding and Howard, 1998; Lund et al., 1995). ATP and NAD also serve as substrates for posttranslational protein modifications, i.e. phosphorylation and ADP-ribosylation.

It has been shown that ecto-ATP can induce death of T cells and macrophages (Canaday et al., 2002; Chvatchko et al., 1996; Di Virgilio et al., 2001; Labasi et al., 2002; Lammas et al., 1997; MacKenzie et al., 2001; Surprenant et al., 1996; Zanovello et al., 1990). ATP-induced activation of the cytolytic P2X7 purinoreceptor induces

calcium flux, formation of large membrane pores, exposure of phosphatidylserine and uptake of propidium iodide, ultimately resulting in cell death. However, millimolar concentrations of ATP were required to elicit these responses. It has remained a mystery how such high ATP concentrations could be derived from natural sources. Here we delineate a mechanism for activating P2X7 by a ligand generated from endogenous sources.

Cytotoxicity mediated by protein ADP-ribosylation is a common theme of many bacterial pathogens that pose significant human health threats (*C. diphtheriae*, *V. cholerae*, *E. coli*, *B. pertussis*, *S. entericae*, *C. botulinum*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) (Aktories and Just, 2000; Domenighini and Rappuoli, 1996). Symptoms of diphtheria, whooping cough, and severe diarrhea, are caused by ADP-ribosylating enzymes that translocate into mammalian cells. These toxins interfere with protein synthesis, signal transduction or cytoskeletal functions by ADP-ribosylating key target proteins such as elongation factor 2, G proteins, or actin. Mammalian ADP-ribosylating ectoenzymes, designated ART1-ART5, have been discovered that bear distant sequence similarity to these bacterial toxins (Glowacki et al., 2002; Haag and Koch-Nolte, 1997; Okazaki and Moss, 1998). Mammalian ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs) have been shown to ADP-ribosylate T cell membrane proteins and secretory antibacterial factors (Liu et al., 1999; Paone et al., 2002). The recently solved crystal structure of rat ART2 confirms the close structural and evolutionary relationship of mammalian ARTs and ADP-ribosylating bacterial toxins (Mueller-Dieckmann et al., 2002). The results presented here demonstrate that ART2.2 and ADP-ribosylating bacterial toxins share not only a common structure and enzymatic activity, but also a common function: cytotoxicity. We show that micromolar concentrations of NAD derived from endogenous sources are sufficient to kill T cells by activating P2X7 via ART2.2-catalyzed ADP-ribosylation of cell surface proteins.

Results

Exposure of T cells to the ART substrate, NAD, induces cell death

Exposure of phosphatidylserine is an early sign of apoptosis, uptake of propidium iodide, DNA fragmentation and decrease of cell size are late indicators of cell death (Bossy-Wetzel and Green, 2000). In accord with previous reports (Adirouch, Liu), treatment of lymph node T cells with exogenous NAD induced exposure of phosphatidylserine (PS) (**Fig. 1A**). Ultimately, this led to irreversible uptake of propidium iodide (PI) (**Fig. 1B**), a profound decrease in cell size and increase in granularity (**Fig. 1C**). In contrast, ADP-ribose, which can be generated from NAD by extracellular NAD-glycohydrolases (Lund et al., 1995), did not induce PS-exposure or PI-uptake, even at 100 fold higher concentrations (**Fig. 1A**). NAD-induced cell death (NICD) was prevented effectively by preincubating cells with antibodies directed against cell surface ADP-ribosyltransferase ART2.2 (**Fig. 1 A, C**). These findings indicated that ART2.2-catalyzed, NAD-dependent ADP-ribosylation of cell surface proteins triggers apoptosis of T cells.

NAD-analogues with modifications of the adenine group block NICD

The NAD-analogue etheno-NAD is an efficient substrate for ecto-ART2.2, and etheno-ADP-ribosylation of cell surface proteins can be monitored conveniently by flow cytometry with 1G4, a monoclonal antibody specific for etheno-adenosine (Kahl et al., 2000; Krebs et al., 2003). Remarkably, incubation of cells with etheno-NAD did not induce apoptosis (**Fig. 1A, B, Fig. 2B**) despite efficient incorporation of etheno-ADP-ribose into cell surface proteins (**Fig. 2A**). Strikingly, preincubation of cells with etheno-NAD effectively protected cells from subsequent NAD-induced PS-exposure (**Fig. 2C**). Similar results were obtained with the NAD-analogues nicotinamide guanine dinucleotide (NGD) and nicotinamide hypoxanthine dinucleotide (NHD) (**Fig. 2 B, C**). Etheno-NAD, NGD and NHD differ from NAD only in their adenine

moieties (see supporting online material, **Fig. 8**). The finding that ADP-ribosylation but not etheno-ADP-ribosylation induced apoptosis indicated to us that an essential downstream effector of cell surface protein ADP-ribosylation senses this difference on the adenine group.

NAD induces calcium flux and formation of membrane pores

Members of the purinoreceptor family of cell surface proteins are known to be sensitive to modifications of the adenosine moiety on their ligands (North and Surprenant, 2000) and thus represent good candidates for the downstream effector. Furthermore, PS-exposure and cytotoxicity are well-known effects of ATP-induced triggering of the P2X7 receptor (Di Virgilio et al., 2001; Zanovello et al., 1990). Hallmarks of P2X7-triggering are induction of calcium flux and formation of membrane pores permeable to molecules up to 800 Da. The latter can be monitored by uptake of fluorescent DNA-binding compounds such as ethidium bromide and YO-PRO-1 (Di Virgilio et al., 2001; North and Surprenant, 2000). We, therefore, next tested whether calcium flux and dye uptake can be elicited by NAD. Indeed, intracellular calcium levels increased within 30 seconds after addition of ecto-NAD (**Fig. 3A**). Moreover, within 30 minutes after treatment with NAD or ATP, T cells became permeable to ethidium bromide and YO-PRO-1 (**Fig. 3B and C**). Note that NAD-induced dye uptake was restricted to T cells, whereas B cells were completely resistant to these effects (**Fig. 3C**).

P2X7 antagonists block NICD

To further investigate the involvement of P2X7 in NICD, we tested the effects of known antagonists of P2X7 (Abbracchio and Burnstock, 1994; North and Surprenant, 2000). Preincubation of cells with the P2X7 antagonists KN-62 or oxidized ATP (oATP), effectively blocked both NAD-induced and ATP-induced PS-exposure (**Fig.**

3D), calcium flux (**Fig. 3E**), and dye uptake (not shown). Taken together, these results strongly suggest that NAD induces PS-exposure and pore-formation by activating the P2X7 receptor, e.g. as a consequence of ADP-ribosylation of membrane proteins.

NAD itself is not a ligand for P2X7

It was conceivable that NAD itself functions as a ligand for P2X7. To address this question, we analyzed the response of T cells from ART2^{-/-} mice. ART2-deficient T cells (Ohlrogge et al., 2002) were resistant to NICD but sensitive to direct triggering of P2X7 by ATP (**Fig. 4A**), ruling out the possibility that NAD itself is a ligand for P2X7. Note, that T cells harboring the P451L mutant P2X7 receptor (Adriouch et al., 2002) showed markedly reduced responses to both, NAD and ATP. These findings indicated that NICD requires both, ART2-catalyzed ADP-ribosylation of cell surface proteins and triggering of the P2X7 receptor and that NAD triggers P2X7 indirectly, i.e. via ADP-ribosylation of cell surface targets.

Cotransfection of ART2.2 and P2X7 confers sensitivity to NAD-induced PS-exposure and pore formation

Moreover, cotransfection of HEK293 cells with ART2.2 and P2X7 rendered double transfectants sensitive to NAD-induced PS-exposure and dye uptake while single transfectants were resistant (**Fig. 4B, C**). Note that the effect of NAD was less pronounced on ART2.2/P2X7 cotransfected HEK cells than on wild type T cells, and required higher NAD concentrations. Proteomics studies have shown that P2X7 is surrounded by a complex set of different proteins (Kim et al., 2001). These findings suggest that the environment of P2X7 and ART2.2 is not the same in mouse T cells and human HEK cells, and that the signaling pathways activated by P2X7 (Budagian et al., 2003; Humphreys et al., 2000; Wilson et al., 2002) differ in these two cell types.

NAD activates P2X7 at much lower concentrations than does ATP

The results of dose-response analyses (**Fig. 5A**) reveal that NAD is much more effective than ATP at inducing T cells to expose PS (EC₅₀ 2 μ M versus 100 μ M). Moreover, the response to ATP shows a threshold effect, and doses below 50 μ M ATP do not induce exposure of PS. In contrast, NAD already induces PS-exposure of some cells at concentrations as low as 1 μ M. With increasing concentrations of NAD a steady increase in the number of cells exposing PS is observed, but a fraction of cells evidently remains resistant to NAD. Double staining for ART2.2 and AnnexinV showed that the latter correspond to T cells not expressing ART2.2 (not shown) (Adriouch et al., 2001).

ATP-induced but not NAD-induced PS-exposure is readily reversed

It was shown recently that ATP-induced exposure of PS on human macrophages is reversible if ATP is removed from cells by washing (MacKenzie et al., 2001). In order to investigate whether PS-exposure induced by NAD or ATP on T cells also is reversible, we treated T cells for 5 minutes with NAD or ATP, removed the nucleotides by washing and incubated the cells further. The results show that T cells, like macrophages, reverse PS-exposure after removal of ATP (**Fig. 5B**). In striking contrast, NAD-induced PS-exposure shows little if any recovery upon removal of NAD (**Fig. 5C**). The reversibility of the response to ATP is compatible with that of a receptor to its soluble ligand. The prolonged reaction to NAD is indicative of a long-lasting signal, e.g. as caused by covalent modification of the receptor or by covalent attachment of its ligand to the cell surface.

The cytotoxic effects of NAD are not mediated by endogenous ATP

It was conceivable that the cytotoxic effects of NAD described so far are mediated by ATP released from cells. For example, ADP-ribosylation of membrane proteins might cause the release of ATP leading to the activation of P2X7 by ATP of

endogenous origin. In order to address this question, we treated T cells with NAD or ATP in the presence of the potent ATP-hydrolase apyrase (**Fig. 6**). The results show that apyrase completely blocks ATP-induced PS-exposure even at very high concentrations of exogenous ATP, whereas it has no effect on NAD-induced PS-exposure. We conclude that the effects of NAD are mediated by cell surface ADP-ribosylation and not by endogenous ATP.

NAD released by cell lysis or during inflammation can induce death

If NICD were to play a physiological role, the effects described above should be inducible also with endogenous sources of NAD. To test whether NAD released from lysed cells can induce cell death, we exposed T cells to the material released from cells disrupted by freeze/thawing or treatment with ultrasound. Indeed, T cells from wildtype mice responded with PS-exposure and PI-uptake (**Fig. 6A**). In striking contrast, T cells from ART2^{-/-} mice did not show PS-exposure or PI-uptake upon exposure to cell lysates.

Very similar results were obtained with inflammatory exudates provoked in vivo by subcutaneous application of polyacrylamide microbeads (**Fig. 6B**) (Stiffel et al., 1990). The cytotoxic effects of inflammatory exudates and of cell lysates on wild type T cells were prevented by pretreatment of cells with ART2-specific antibodies, etheno-NAD, and by the addition of NADase, implying that the effective T cell cytotoxic agent released upon cell rupture is NAD. Indeed, the NAD concentrations in these biological samples were determined to 2-20 μ M, i.e. in a range above the EC 50 for NICD.

Discussion

Our study addresses the role of extracellular nucleotides and nucleotide metabolizing lymphocyte ectoenzymes in the immune system. The results delineate a novel mechanism for inducing T cell death: NAD released during tissue injury and inflammation serves as a substrate for ART2.2, which catalyzes ADP-ribosylation of cell surface proteins on resting T cells. This in turn activates the P2X7 cytolytic receptor and ultimately causes T cell death. Importantly, these findings provide the first convincing demonstration of P2X7 activation by an endogenous ligand.

Proposed roles of P2X7 in immunity include the release of IL-1, killing of intracellular pathogens, and cytotoxicity toward immune cells (Canaday et al., 2002; Chvatchko et al., 1996; Di Virgilio et al., 2001; Labasi et al., 2002; Lammas et al., 1997; MacKenzie et al., 2001; Zanovello et al., 1990). However, millimolar concentrations of exogenous ATP were required to elicit these P2X7-mediated response. It has remained a puzzle how such high ATP concentrations could be derived from natural sources. Here we describe a new way of activating P2X7 on T cells, not via ATP but via ADP-ribosylation of cell surface proteins. Importantly, we demonstrate that P2X7 can be activated by a ligand stemming from an endogenous source, i.e. inflammatory exudates and cell lysates. Because suitable antibodies are still lacking, we have not yet been able to determine whether P2X7 itself is a target for ADP-ribosylation. An alternative possibility is that a distinct ADP-ribosylated protein provides an efficient ligand for P2X7 (**Fig. 8**).

The EC_{50} for NAD-mediated activation of P2X7 is in the micromolar range (i.e. 2 μ M for PS-exposure). We demonstrate that sufficient concentrations of ecto-NAD to activate P2X7 are readily reached upon rupture of cells. Importantly, our results show that NAD, not ATP, is the active cytotoxic principle in cell lysates, since cytotoxicity is blocked by NADase, or by preincubation with etheno-NAD or with ART2-antibodies and since ART2-deficient T cells are resistant to NICD. Moreover, our results using the

model of the inflammatory response to Biogel (Stiffel et al., 1990) provide a proof of principle that sufficient NAD concentrations to activate P2X7 can be obtained in vivo. In this context it is of interest to note that endogenous ADP-ribosylation of extracellular proteins has been demonstrated previously in inflammatory exudates, i.e. broncheolar lavage of smokers (Paone et al., 2002).

Are NAD-induced cell death and other cell death-program redundant or do they play distinct roles in immune responses? We show here that NICD affects resting T cells, i.e. T cells isolated from mice not undergoing an overt immune response. In contrast previous activation of T cells is a prerequisite for activation induced cell death (AICD) mediated by death-receptors (Krammer, 2000). Interestingly, we have observed that activation of T cells by PMA or ConA markedly reduces the sensitivity to NICD (our own unpublished observations). This is consistent with shedding of ART2.2 from the cell surface under these conditions (Kahl et al., 2000). *It is tempting to speculate* that NICD affects mainly cells not participating in an immune reaction. We propose that NICD thereby provides a mechanism to block the undesirable activation of bystander T cells. Our future studies will address the question whether defects in NICD contribute to autoimmune diseases, lymphoproliferative diseases and/or other immunopathologies.

The results reported here illustrate a new variation of the theme of cytotoxicity mediated by protein ADP-ribosylation: T cell death induced by ART2.2-catalyzed opening of the P2X7 membrane pore. This functional link between bacterial ADP-ribosylating toxins and mammalian ADP-ribosylating ectoenzymes nicely complements the close structural link between these enzymes revealed by sequence analyses and by the recently solved 3D structure of ART2.2 (Glowacki et al., 2002; Mueller-Dieckmann et al., 2002).

This is the first study reporting the activation of a purinoreceptor by a toxin-related endogenous ecto-ADP-ribosyltransferase. The results provide new insights into

the role of ecto-ARTs in regulating T cell functions and identify P2X7 as a key downstream effector in NICD. These findings establish an important precedent for further studies on links between ADP-ribosylation and purinoreceptors in other contexts and open the exciting perspective of utilizing the pharmacology of NAD and its analogues to modify the function of P2X7 and other purinoreceptors.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the DFG (to FH and FK-N) and the MENRT (to MS). SA was recipient of a fellowship from ARC. We thank Wiebke Ohlrogge, Claudia Dox, Fenja Braasch, and Gudrun Dubberke, Vivienne Welge, Hamburg, and S. Pechberty, Paris, for technical assistance. Parts of the work described in this study represent the partial fulfilment of the requirements for the graduate theses of SA, FS and CK. FK-N, FH, and MS designed and supervised the study. DF, FS, CK, FH, and FK-N performed the experiments described in Figs. 1, 2A, 3B, -C, 4A, 5B, -C, 6, and 7A; SA and MS those in Figs. 2B, -C, 3A,-D,-E, 4B,-C, 5A, and 7B. FK-N wrote the paper. The authors are indebted to Dr Philippe Deterre (Paris) for his kind help with calcium flux determination. We thank Drs. Edward H. Leiter, Francesco Di Virgilio, Bernhard Fleischer, and Stefan Rothenburg for critical reading of the manuscript.

Figure legends

Figure 1. *NAD-induces cell death via ART2.2.* T cells were incubated for 30 minutes (A) or 16 hours (B, C) in the absence or presence NAD, ADP-ribose or etheno NAD. Cells were then washed and stained with AnnexinV and propidium iodide (PI). Cells depicted in A, panels 5 and 6 and in C, panel 3, were pretreated for 20 minutes with ART2-specific or control antibodies. Cells were then washed and treated with NAD for 30 minutes prior to staining with AnnexinV/PI.

Figure 2. *NAD-induced PS-exposure can be prevented by pretreatment of cells with NAD analogues bearing modifications in the adenine moiety* (A) T cells were incubated for 30 minutes with or without 20 μ M etheno-NAD, washed and then stained with fluorochrome-conjugated etheno-adenosine-specific mAb 1G4 (Krebs et al., 2003). (B) T cells were incubated for 30 minutes with NAD, etheno-NAD, NGD, or NHD as indicated and then stained with AnnexinV/PI as in Fig. 1. (C) T cells were preincubated for 30 minutes with the indicated concentrations etheno-NAD, NGD, or NHD, washed, treated with 30 μ M NAD and stained as in (B).

Figure 3. *NAD induces responses characteristic of P2X7 which are blocked by P2X7 antagonists.* (A) Fura-2 loaded T cells were stirred in a fluorimeter cuvette. NAD was added as indicated and changes in cytosolic Ca²⁺ were monitored by fluorometry with excitation at 340 nm and emission at 500 nm. (B) T cells were incubated for the indicated times in the presence of 10 μ M NAD. Ethidium bromide (1 μ g/ml) was added for the last 2 minutes prior to counterstaining with AnnexinV. (C) Lymph node cells were incubated for 30 minutes in the absence or presence of NAD or ATP. YO-PRO-1 (10 μ g/ml) was added for the last 2 minutes prior to counterstaining with anti-mouse IgG. (D) T cells were preincubated for 120 minutes with P2X7 antagonists KN-62 or oxidized ATP, washed, and incubated further for 30 minutes in the presence of 10 μ M NAD or 300 μ M ATP. Cells were then washed and stained with AnnexinV/PI. (E)

Fura-2 loaded T cells were preincubated with or without KN-62 for 5 min in a stirred fluorimeter cuvette. NAD was added as indicated and changes in cytosolic Ca^{2+} were monitored by fluorometry as in (A).

Figure 4. *NAD-induced PS-exposure and pore formation require both, functional ART2.2 and P2X7.* (A) T cells from ART2/P2X7 wildtype mice (top), ART2-deficient mice (Ohlrogge et al., 2002), and P2X7-defective mice (bottom) (Adriouch et al., 2002) were incubated for 30 minutes in the absence or presence of NAD or ATP and then stained with AnnexinV/PI. (B, C) HEK cells stably transfected with P2X7 (Adriouch et al., 2002) were super-transfected with ART2.2. Seven days post transfection, cells were treated with NAD or ATP and then stained with AnnexinV/PI (B) or YO-PRO-1 (C) as in Fig. 3.

Figure 5. *NAD is more effective than ATP at inducing PS-exposure and ATP-induced PS-exposure is readily reversed but NAD-induced PS-exposure is not.* (A) T cells were incubated for 30 minutes with the indicated concentrations of NAD or ATP and then stained with AnnexinV/PI. (B) and (C) T cells were incubated for 5 minutes with the indicated concentrations of ATP (B) or NAD (C), washed, and then incubated further in the absence of exogenous nucleotides. At the times indicated, cells were washed and stained with AnnexinV/PI.

Figure 6. *NICD is not mediated by endogenous ATP.* T cells were incubated for 30 minutes with NAD or ATP in the presence or absence of potato apyrase (ATPase) or *neurospora crassa* NAD glycohydrolase (NADase), cells were washed and stained with AnnexinV/PI.

Figure 7. *NICD with endogenous NAD in cell lysates or inflammatory exudates* (A) T cells obtained from ART2.2-wildtype (top) or ART2.2-deficient mice (bottom) were incubated for 30 minutes with NAD or with erythrocyte lysates. Cells were washed,

incubated for an additional 24 hours and then stained with AnnexinV/PI. Cells in panels 4 and 5 were preincubated with ART2-specific antibodies or with etheno NAD for 20 minutes prior to addition of erythrocyte lysates. **(B)** T cells were incubated for 30 minutes with NAD or with inflammatory exudates, washed and stained with AnnexinV/PI. Cells in panel 4 were incubated with exudate in the presence of NAD-glycohydrolase, cells in panel 5 were preincubated with 20 μ M etheno NAD before addition of exudate.

Figure 8. Schematic model of possible mechanisms for NAD-mediated opening of P2X7 on T cells through GPI-anchored ADP-ribosylating ectoenzyme ART2.2. **(A)** ART2.2 catalyzes ADP-ribosylation of a cell surface target. The ADP-ribosylated target then acts as an agonistic ligand for P2X7. **(B)** ART2.2 catalyzes ADP-ribosylation of P2X7 itself and thereby induces pore-formation. N and C denote terminal amino acid residues.

Supplemental Figure 9. Schematic diagram of compounds used in this study to induce or to block T cell apoptosis.

Experimental procedures

Reagents and mice. ADP-ribose, ATP, NAD, etheno-NAD, NGD, NHD, oxidized ATP, KN-62 (1-[N, O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine), G418, and potato apyrase were from Sigma Chemical Company; YO-PRO-1, ethidium bromide, and propidium iodide were from Molecular Probes. Mice were obtained from the Animal Resources Units of the University Hospital Hamburg and of Diderot University, Paris. BALB/c mice were used in all experiments except where otherwise indicated. ART2-deficient mice were generated by standard homologous recombination procedures and backcrossed for 5 generations onto the BALB/c background as described elsewhere (Ohlrogge et al., 2002).

Assays for phosphatidylserine exposure and pore formation. Single cell suspensions from spleen and lymph nodes were prepared and processed for flow cytometry on a FACS-Calibur (Becton Dickinson) as described (Adriouch et al., 2001; Koch-Nolte et al., 1999). B cells were depleted using magnetic cell separation with Dynabead-immobilized goat anti-mouse IgG (Dyna). HEK293 cells stably expressing wildtype mouse P2X7 (Adriouch et al., 2002) were transfected with an expression construct encoding FLAG-tagged ART2.2 (Koch-Nolte et al., 1999) using lipofectamine (Life Technologies) and propagated for seven days in the presence of G418. Following treatment with NAD or ATP at 37°C, cells were washed in RPMI medium (Life Technologies) supplemented with 2mM CaCl₂, and were then stained for 20 minutes on ice with FITC-conjugated AnnexinV (1µg/ml) (Becton Dickinson) and propidium iodide (10µg/ml) or PE-conjugated anti-mouse IgG. For assay of pore formation, YO-PRO-1 (10µg/ml) or ethidium bromide (1µg/ml) were added for the last

two minutes of incubation. For pulse chase analyses, cells were treated with NAD or ATP for 5 minutes at 37°C. Cells were then washed and incubated further for the times indicated prior to staining with AnnexinV/PI as above. For the preparation of cell lysates, cells were washed and resuspended in 4 volumes of PBS containing 1 mM ADP ribose. Cells were ruptured either by ultrasonic treatment or by two cycles of snap-freezing in liquid nitrogen and thawing in a 37°C waterbath. Cellular debris was removed by high-speed centrifugation 30 min 15.000 x g at 4°C. NAD concentrations in cell lysates and inflammatory exudates were determined by a sensitive cycling assay (Jacobson and Jacobson, 1997).

Protection of cells from apoptosis with ART2-antibodies, etheno-NAD, NGD, NHD, or P2X7 antagonists. Cells were preincubated in RPMI medium containing ART2-specific antiserum K12760 or preimmune serum (1:200 dilution) (Adriouch et al., 2001; Koch-Nolte et al., 1999), 0-100 µM etheno NAD, NGD, or NHD for 30 minutes at 37°C or in medium containing 0-1000 µM oxidized ATP or KN-62 for 2 hours at 37°C. With oxidized ATP, cells were then washed and incubated further in RPMI medium containing NAD or ATP for 30 min at 37°C prior to staining with AnnexinV/PI or YO-PRO-1 as described above. All results shown are representative of at least three similar and independent experiments.

References

- Abbracchio, M. P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64, 445-475.
- 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.
- Adriouch, S., Ohlrogge, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Seman, M. (2001). Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. *J Immunol* 167, 196-203.
- Aktories, K., and Just, I. (2000). *Bacterial Protein Toxins* (Berlin, Springer Verlag).
- Bossy-Wetzel, E., and Green, D. R. (2000). Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol* 322, 15-18.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora, A. (2001). Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J* 15, 10-12.
- Budagian, V., Bulanova, E., Brovko, L., Orinska, Z., Fayad, R., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (2003). Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *J Biol Chem* 278, 1549-1560.
- Canaday, D. H., Beigi, R., Silver, R. F., Harding, C. V., Boom, W. H., and Dubyak, G. R. (2002). ATP and control of intracellular growth of mycobacteria by T cells. *Infect Immun* 70, 6456-6459.
- Chvatchko, Y., Valera, S., Aubry, J. P., Renno, T., Buell, G., and Bonnefoy, J. Y. (1996). The involvement of an ATP-gated ion channel, P(2X1), in thymocyte apoptosis. *Immunity* 5, 275-283.
- Contreras, J. E., Sanchez, H. A., Eugenin, E. A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V., and Saez, J. C. (2002). Metabolic inhibition induces

opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 495-500.

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., and Baricordi, O. R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* *97*, 587-600.

Domenighini, M., and Rappuoli, R. (1996). Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol Microbiol* *21*, 667-674.

Glowacki, G., Braren, R., Firner, K., Nissen, M., Kuhl, M., Reche, P., Bazan, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2002). The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* *11*, 1657-1670.

Goding, J. W., and Howard, M. C. (1998). Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev* *161*, 5-10.

Haag, F., and Koch-Nolte, F. (1997). *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)transferases and Related Enzymes*, Vol 419 (New York, Plenum Press).

Humphreys, B. D., Rice, J., Kertesy, S. B., and Dubyak, G. R. (2000). Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem* *275*, 26792-26798.

Jacobson, E. L., and Jacobson, M. K. (1997). Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans. *Methods Enzymol* *280*, 221-230.

Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E. H., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2000). Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* *165*, 4463-4469.

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.

- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Ablamunits, V., Leiter, E. H., and Haag, F. (1999). A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol* *163*, 6014-6022.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* *407*, 789-795.
- Krebs, C., Koestner, W., Nissen, M., V. Welge, Parusel, I., Malavasi, F., Leiter, E., Santella, R. M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2003). Flow cytometric and immunoblot assays for monitoring cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for etheno-adenosine. *Anal Biochem*, in press.
- 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.
- 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.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 589-598.
- Liu, Z. X., Yu, Y., and Dennert, G. (1999). A cell surface ADP-ribosyltransferase modulates T cell receptor association and signaling. *J Biol Chem* *274*, 17399-17401.
- Lund, F., Solvason, N., Grimaldi, J. C., Parkhouse, R. M., and Howard, M. (1995). Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol Today* *16*, 469-473.
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., and Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* *15*, 825-835.
- Mueller-Dieckmann, C., Ritter, H., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Schulz, G. (2002). Structure of the Ecto-ADP-ribosyl Transferase ART2.2 from Rat. *J Mol Biol* *322*, 687-696.

North, R. A., and Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 563-580.

Ohlrogge, W., Haag, F., Lohler, J., Seman, M., Littman, D. R., Killeen, N., and Koch-Nolte, F. (2002). Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22, 7535-7542.

Okazaki, I. J., and Moss, J. (1998). Glycosylphosphatidylinositol-anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases. *J Biol Chem* 273, 23617-23620.

Paone, G., Wada, A., Stevens, L. A., Matin, A., Hirayama, T., Levine, R. L., and Moss, J. (2002). ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8231-8235.

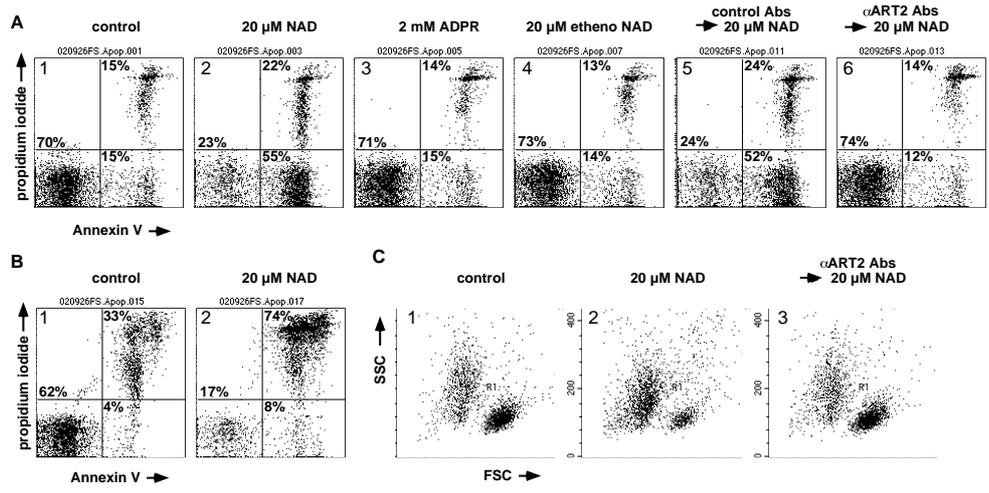
Stiffel, C., Ibanez, O. M., Ribeiro, O. G., Decreusefond, C., Mouton, D., Siqueira, M., and Biozzi, G. (1990). Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. *Exp Clin Immunogenet* 7, 221-233.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-738.

Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248.

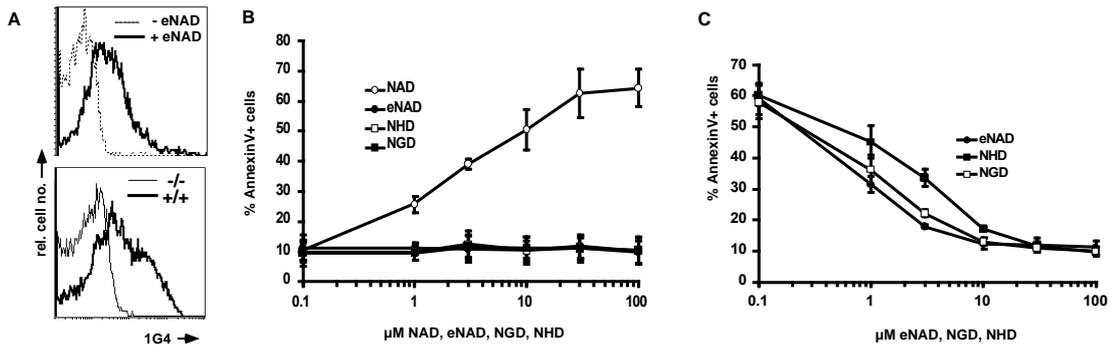
Wilson, H. L., Wilson, S. A., Surprenant, A., and North, R. A. (2002). Epithelial Membrane Proteins Induce Membrane Blebbing and Interact with the P2X7 Receptor C Terminus. *J Biol Chem* 277, 34017-34023.

Zanovello, P., Bronte, V., Rosato, A., Pizzo, P., and Di Virgilio, F. (1990). Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *J Immunol* 145, 1545-1550.



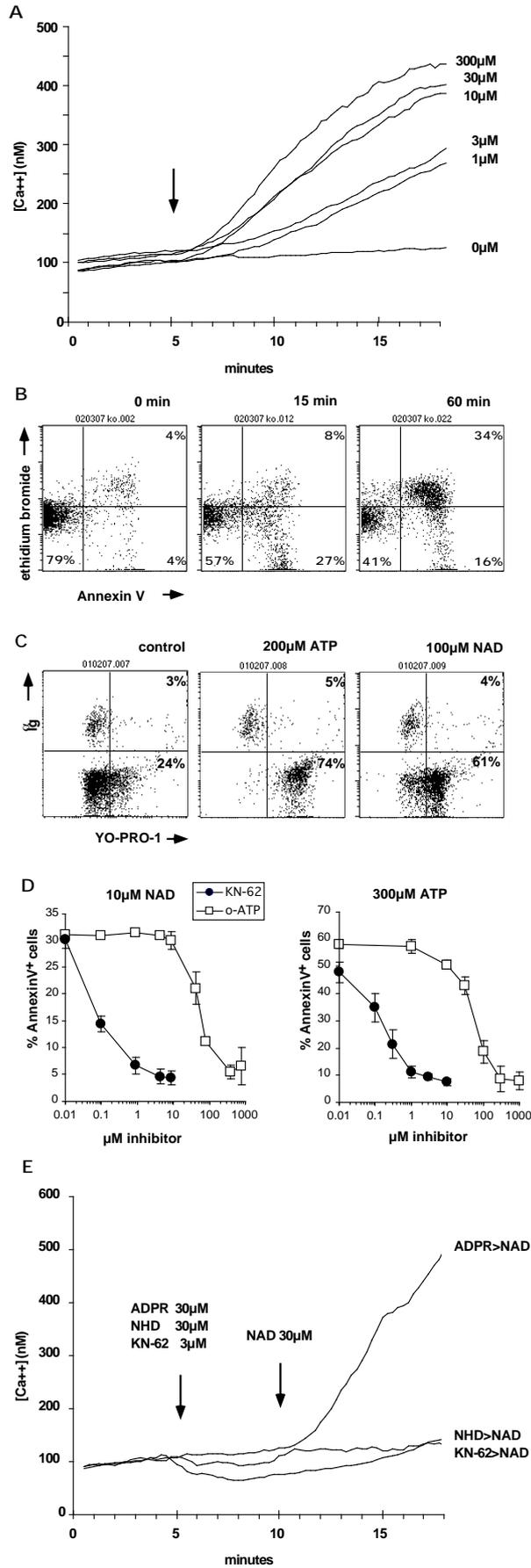
Seman, et al.

Fig. 1. NAD-induces cell death via ART2.2



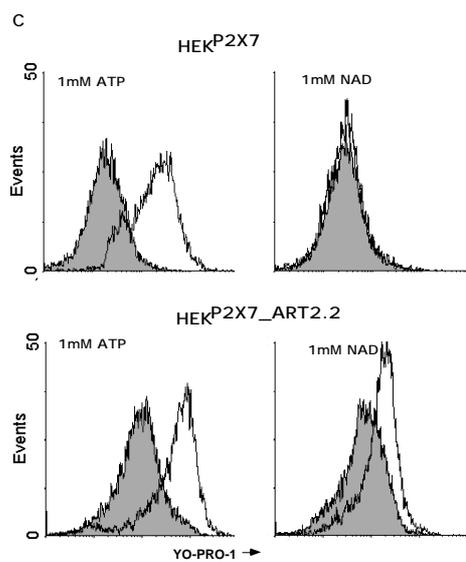
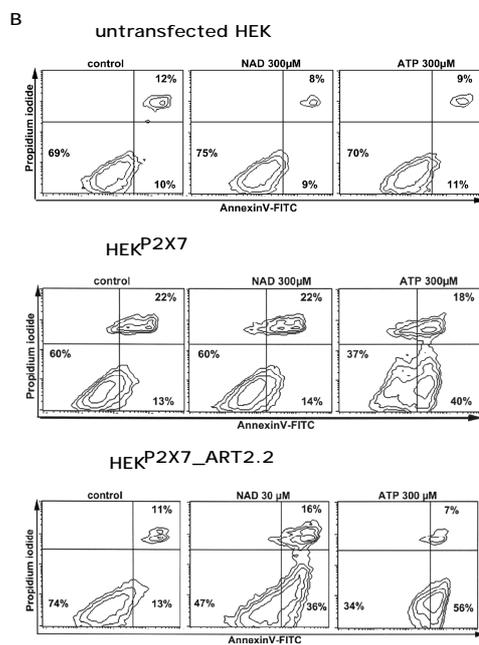
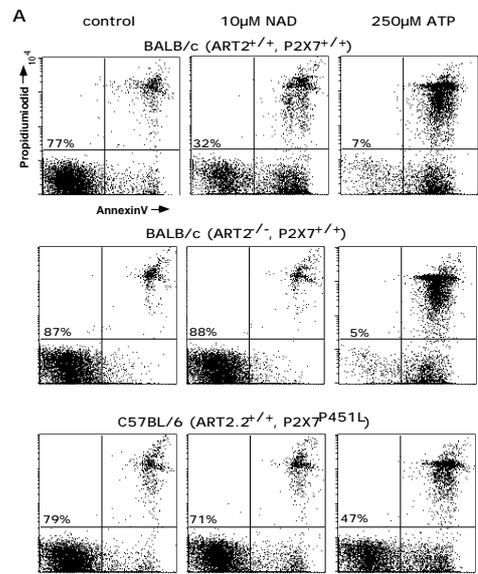
Seman, *et al.*

Fig. 2. NAD-induced PS-exposure can be prevented by pretreatment of cells with NAD analogues bearing modifications in the adenine moiety



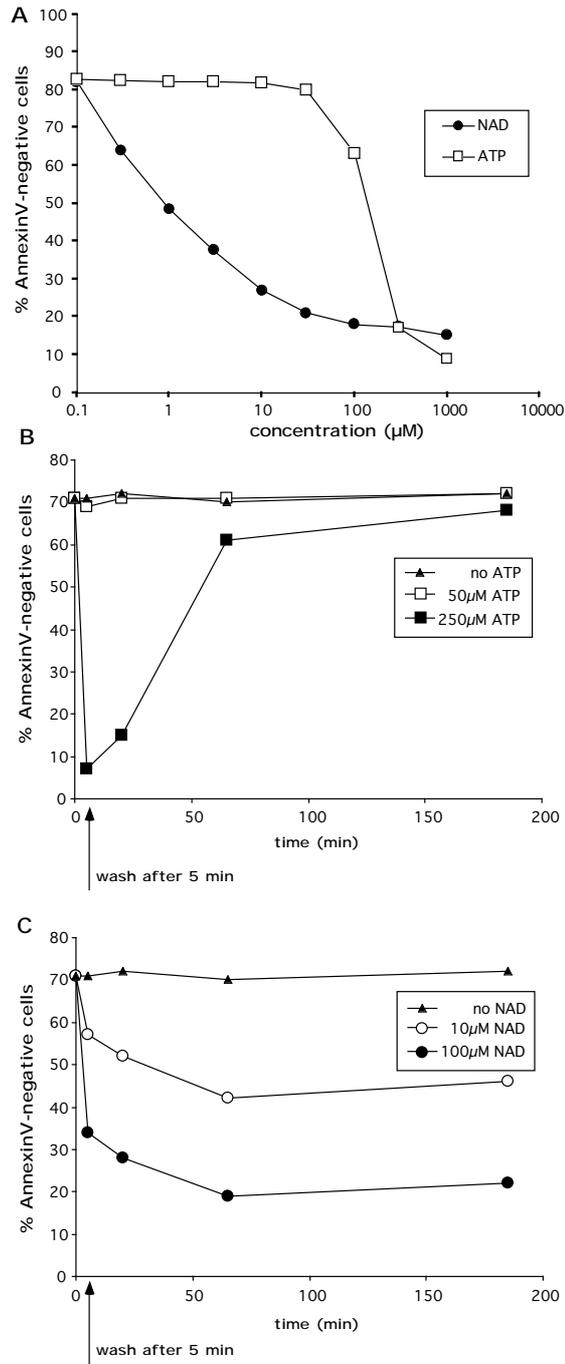
Seman *et al.*

Fig. 3. NAD induces responses characteristic of P2X7 which are blocked by P2X7 antagonists.



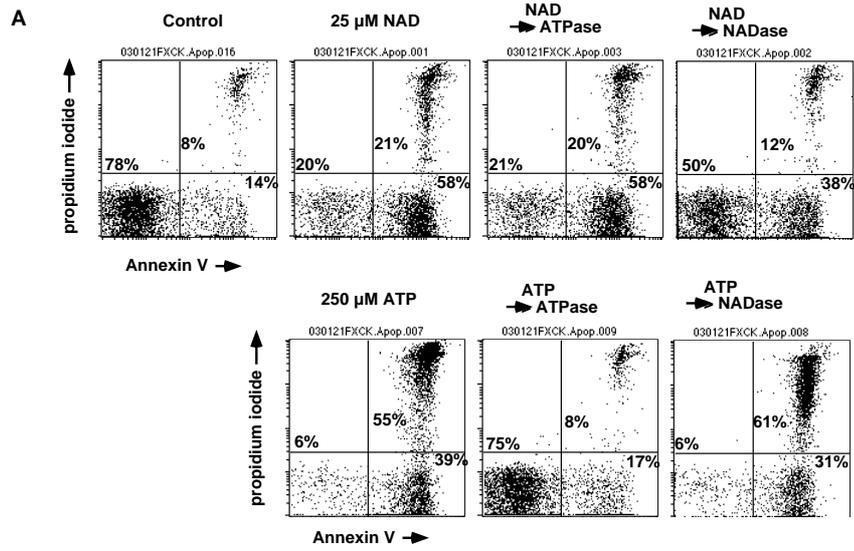
Seman, *et al.*

Fig. 4. NAD-induced PS-exposure and pore formation require both, functional ART2.2 and P2X7

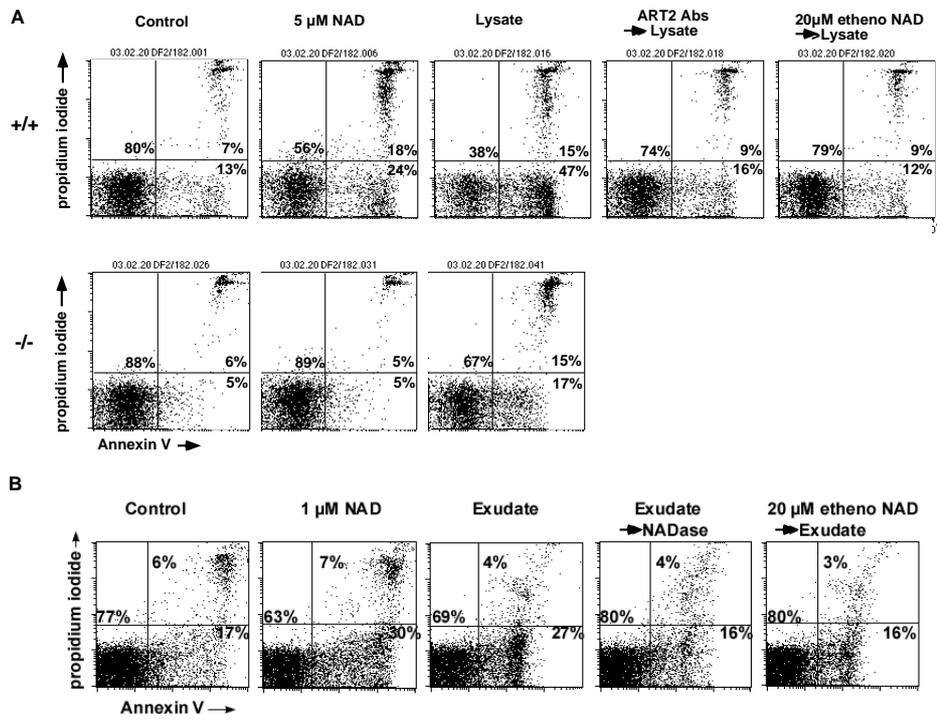


Seman, *et al.*

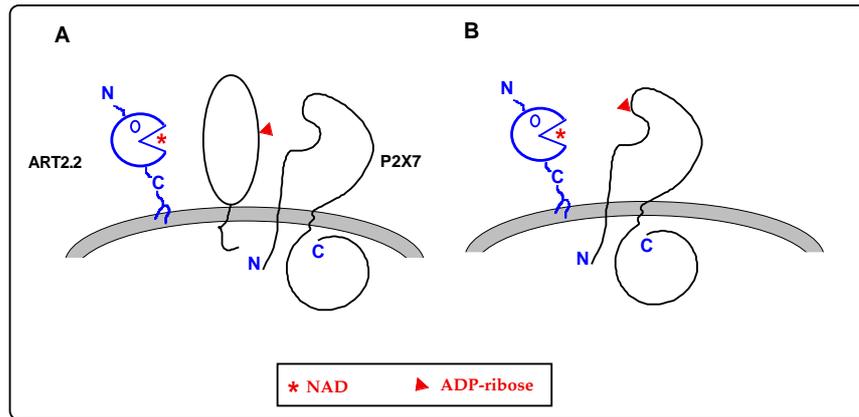
Fig. 5. NAD is more effective than ATP at inducing PS exposure and ATP-induced PS-exposure is readily reversed but NAD-induced PS-exposure is not



Seman *et al.*
 Fig. 6 NICD is not mediated by endogenous ATP

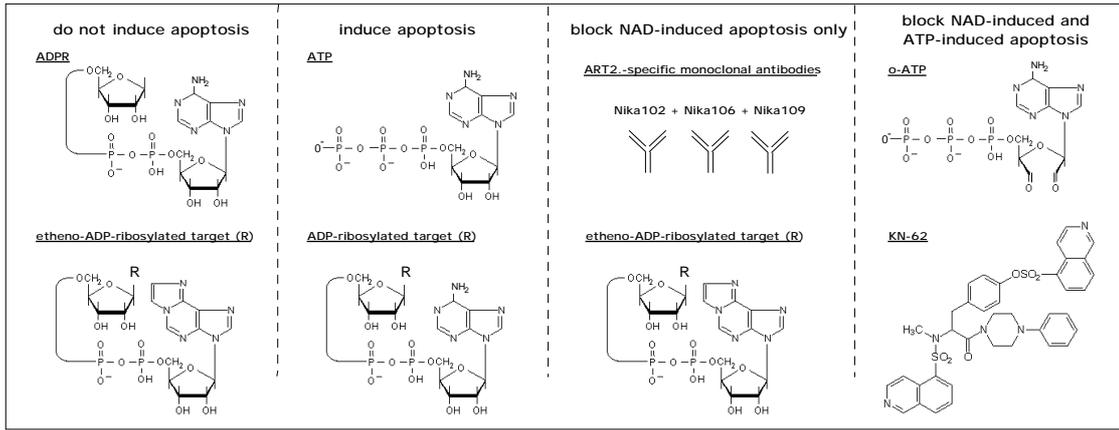


Seman *et al.*
 Fig. 7 NICD with endogenous NAD in cell lysates or inflammatory exudates



Seman *et al.*

Fig. 8 Schematic models of possible mechanisms for NAD-mediated opening of P2X7 on T cells through GPI-anchored ADP-ribosylating ectoenzyme ART2.2



Seman, *et al.*

supplemental figure

Schematic diagrams of compounds used in this study to induce and block apoptosis

ARTICLE 4

**T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis
induced by extracellular NAD¹**

Friedrich Haag^{*2}, Dunja Freese*, Felix Scheublein*, Wiebke Ohlrogge*, Sahil Adriouch[§],
Michel Seman[§], and Friedrich Koch-Nolte*

* Institute for Immunology, University Hospital, D-20246 Hamburg, Germany
(Institute for Immunology, University Hospital, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg,
Germany)

[§] Laboratoire d'Immunodifferentiation, Université Denis Diderot, Paris, France
(Laboratoire d'Immunodifferentiation, EA 1556, Université Denis Diderot, Paris 7,
CP7124, Tour 54, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France)

RUNNING TITLE: NAD-induced apoptosis in T cells

14 manuscript pages

4 figures

¹

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Friedrich Haag, Institute for Immunology, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany. Tel: +49-40-428034595; Fax: +49-40-428034243; e-mail: haag@uke.uni-hamburg.de

ABSTRACT

Extracellular nucleotides such as ATP and NAD can profoundly affect the functions of lymphocytes, macrophages, and other cells. We have recently shown that extracellular NAD induces rapid apoptosis in naive T cells by a mechanism involving the ADP-ribosylation of cell surface molecules. In the present paper we describe that T cells of different developmental stages differ in their sensitivity to NAD-induced apoptosis. Thymocytes were less susceptible than peripheral lymph node T cells, and freshly activated cells were more resistant than resting cells. Sensitivity to NAD-induced apoptosis generally correlated with expression of the ADP-ribosyltransferase ART2.2, which is not expressed on thymocytes and shed from peripheral T cells upon activation. Our findings suggest that NAD-induced apoptosis does not play a role during thymic selection of T cells, but rather may play a role by preventing the activation of unwanted bystander T cells during an immune response, and thus may participate in the control of autoimmunity.

KEYWORDS: T cells; apoptosis; extracellular nucleotides; ADP-ribosylation; mono(ADP-ribosyl)transferases; Rt6

INTRODUCTION

In order to survive, organisms must maintain a tight control over the numbers and receptor specificities of immune cells. The regulation of cell death and survival is central to this task. Throughout their lifespan, T lymphocytes are continually subject to processes that may result in their death (Van Parijs and Abbas, 1998). Regulated cell death may result either from the withdrawal of survival signals (death by neglect) or from the receipt of death signals (actively induced cell death). A prototype of this latter mechanism is the induction of apoptosis via signals transmitted through the TNFR family of death receptors. We have recently reported that micromolar concentrations of extracellular NAD induce apoptosis in T cells via a mechanism involving the ADP-ribosylation of cell surface molecules (Adriouch et al., 2001). Besides the availability of ecto-NAD, cell death in this model required the presence of a cell surface mono(ADP-ribosyl)transferase (ART), as well as one or more unknown downstream effector molecules, presumably targets of ADP-ribosylation and/or components of the signal transduction machinery.

ARTs post-translationally modify proteins by transferring an ADP-ribose moiety from NAD to specific amino acids, e.g. arginine residues, of target proteins. ARTs have well-characterized regulatory functions in the prokaryotic world (Ludden, 1994). Several prokaryotic ARTs are secreted and function as toxins that exert potent effects on mammalian cells by inactivating key proteins in their target cells (Koch-Nolte and Haag, 1997). In mammals, a family of toxin-related extracellular ARTs has been identified that are expressed either as GPI-anchored or secreted molecules by different cell types (Koch-Nolte and Haag, 1997; Haag and Koch-Nolte, 1998; Glowacki et al., 2002).

ARTs have been implicated in T cell differentiation and the regulation of immune function. Rat ART2, formerly known as RT6, is a marker for mature T cells (Thiele et al., 1997). A subset of ART2⁺ T cells exerts a regulatory function in the BB rat model for

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

autoimmune diabetes mellitus (Greiner et al., 1986; Greiner et al., 1987). T cells from diabetes-prone BB rats show reduced expression of ART2, and transfer of ART2+ T cells from diabetes-resistant rats prevents the disease. The mouse carries two *Art2* genes, and, as in the rat, expression of the corresponding gene products, ART2.1 and ART2.2, is restricted to mature T cells (Prochazka et al., 1991; Koch-Nolte et al., 1999). NAD-dependent ADP-ribosylation of cell surface proteins has been shown to inhibit the proliferation and cytotoxic effector functions of CTL lines *in vitro* (Wang et al., 1994; Wang et al., 1996), and to inhibit proliferation (Okamoto et al., 1998) and induce apoptosis (Adriouch et al., 2001; Liu et al., 2001) in primary T cells.

In this report we examine the susceptibility of T cells of different developmental stages to NAD-induced apoptosis. Based on the finding that mature resting T cells represent the cell population most sensitive to NAD-induced cell death, the hypothesis is presented that ART-mediated cell death could play a role in the control of autoimmunity by preventing the activation of bystander cells during an immune reaction.

RESULTS

Ecto-NAD induces Rapid Apoptosis of T Cells by a Mechanism Involving ADP-ribosylation

In a previous report we showed that treatment with extracellular NAD induces rapid T cell death by apoptosis (Adriouch et al., 2001). This is evidenced first by exposure of phosphatidylserine (PS) on the outer leaflet of the plasma membrane, by failure to exclude propidium iodide (**Fig. 1a**), and ultimately by fragmentation of DNA (Adriouch et al., 2001). Induction of apoptosis by NAD is rapid, as PS-exposure evidenced by AnnexinV staining was observed as early as 0,5 minutes after exposure to NAD (**Fig. 1b**).

Thymocytes and Peripheral T Cells Differ in Sensitivity to NAD-induced and CD95-mediated Apoptosis

To examine the sensitivity of T cells at different stages of development to ecto-NAD-induced apoptosis, thymocytes and peripheral lymph node cells were incubated for 2 hours with different concentrations of NAD or with 2 μ g of anti-CD95 antibody, and assayed for PS exposure by AnnexinV staining (**Fig. 2**). Lymph node cells responded to ecto-NAD in a dose-dependent manner, but were resistant to treatment with anti-CD95 antibody. Thymocytes, by contrast, became AnnexinV-positive in response to anti-CD95, but remained resistant to the effects of even 100 μ M ecto-NAD. Concomitant staining for AnnexinV-binding and expression of CD3 showed that among peripheral lymph node cells only T cells are sensitive to ecto-NAD-induced apoptosis. In the thymus, neither immature CD3^{lo} nor the more mature CD3^{hi} cells responded to ecto-NAD, while CD95-mediated apoptosis was observed within the CD3^{lo} population (**Fig. 2b**).

Activated T Cells Shed ART2 and Show Decreased Sensitivity to Ecto-NAD-induced Apoptosis

We have previously reported that T cells release cell surface ART2 upon stimulation with PMA by a metalloproteinase-mediated mechanism (Kahl et al., 2000). To examine whether T cells also become resistant to NAD-induced apoptosis upon activation, purified lymph node T cells were incubated for 2 hours with the polyclonal T-cell stimulators before treatment with NAD. Treatment with either phorbol myristate acetate (PMA) or a combination of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies caused a marked reduction in the level of cell surface ART2.2 compared to untreated cells (**Fig. 3a**). In addition, both treatments

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

also led to increased resistance to NAD-induced apoptosis, as evidenced by reduced staining with AnnexinV and propidium iodide compared to control cells (**Fig.3b**).

DISCUSSION

The maintenance of homeostasis in the immune system and the focussing of immune reactions on appropriate targets require the co-ordinated interplay of regulatory mechanisms, many of which involve programmed cell death (Van Parijs and Abbas, 1998). We have recently identified a new death signal for lymphocytes: the exposure to extracellular NAD (Adriouch et al., 2001). Aim of the present study was to examine the sensitivity of T cells to NAD-induced apoptosis during different stages of development.

In naive peripheral T cells, exposure to ecto-NAD causes exposure of phosphatidylserine and permeabilization to propidium iodide. PS-exposure, as evidenced by AnnexinV-binding, is an early indicator of apoptosis in many cell types (Bossy-Wetzel and Green, 2000). although it has been reported to be reversible in some cases (MacKenzie et al., 2001). In naive peripheral T cells, PS exposure is followed by failure to exclude PI and ultimately by fragmentation of DNA (Adriouch et al., 2001), indicating that these cells indeed have progressed to cell death. NAD-induced apoptosis is rapid, since PS exposure was detected as early as 0.5 minutes following treatment with NAD. Several lines of evidence suggest that the pro-apoptotic effects of NAD are mediated via the ADP-ribosylation of cell surface molecules. First, among peripheral lymphocytes those cells expressing the T cell-specific ADP-ribosyltransferase ART2 are most susceptible to NAD-induced apoptosis (Adriouch et al., 2001). Further, treatment of cells with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), which removes glycosyl-phosphatidylinositol- (GPI-) anchored ART2 from the cell surface, renders cells resistant to NAD-induced apoptosis (Adriouch et al., 2001). Moreover, NAD-induced apoptosis can be blocked by antibodies against ART2 (Adriouch et al., 2001). Finally, activation of T

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

cells, which induces shedding of ART2 (Kahl et al., 2000), correlates with increased resistance to NAD-induced PS-exposure.

T cells are susceptible to programmed cell death at all stages of their development. In the thymus, regulation of apoptosis in the context of positive and negative selection of thymocytes is important for the shaping of the T cell repertoire. In the periphery, resting T cells depend on survival signals for their maintenance. After activation, withdrawal of survival signals and activation-induced cell death (AICD) serve to reduce lymphocyte numbers during the waning of an immune response and to eliminate auto-reactive T cells. Here, we examined the differential sensitivity of thymocytes as well as resting and activated T cells to NAD-induced apoptosis and compared the effects of NAD to a classical "active" death signal, triggering of the CD95 receptor by anti-CD95 antibodies. The results show that mature resting T cells represent the population most susceptible to NAD-induced apoptosis, while thymocytes are completely, and activated lymph node T cells partially resistant. Thus, susceptibility to NAD-induced apoptosis mirrors expression of ART2 (Koch-Nolte et al., 1999). This enzyme is expressed on the surface of mature T cells and shed from the surface of activated T cells by the action of a metalloproteinase (Kahl et al., 2000). Interestingly, NAD-induced apoptosis does not occur within the population of mature CD3hi thymocytes, a portion of which express ART2 (Koch-Nolte et al., 1999). This may be due to the absence in these cells of a downstream effector, which previous studies have shown to be necessary for ART-mediated apoptosis (Adriouch et al., 2001). Resting peripheral T cells were completely resistant to CD95-mediated apoptosis under the conditions employed in our experiments. This presumably reflects a requirement for pre-activation in these cells for the assembly of the death-inducing signalling complex (DISC), necessary for the transduction of death signals via CD95. By contrast, apoptosis

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

was readily visible within the immature CD3lo population of thymocytes, reflecting the importance of CD95 for thymocyte selection (Debatin et al., 1994; Anderson et al., 1996). What may be the biological role of NAD-induced cell death? Our results indicate that ART-mediated apoptosis does not contribute to thymic selection, but rather suggest that the importance of ecto-NAD as a death signal lies within the peripheral T cell compartment. Extracellular NAD differs from other “active“ death signals in several respects. First of all, it induces the exposure of phosphatidylserine more rapidly than signalling via death receptors. Secondly, ecto-NAD as a death signal within the immune system is unique in that it selectively affects mature resting T cells. As discussed above, expression of ART2 is a pre-requisite for NAD-induced apoptosis. Naturally occurring deficiencies of ART2 (formerly designated Rt6) have been observed in several mouse and rat models for autoimmune diseases. It is thus an attractive hypothesis that ecto-NAD-induced cell death contributes to the prevention of autoimmunity. We propose that this occurs by eliminating unwanted bystander cells that may become activated in the course of an immune reaction (**Fig. 4**). Under physiological conditions the concentration of extracellular NAD is low, i.e. in the nanomolar range. Micromolar concentrations of extracellular NAD, which are sufficient to trigger NAD-induced cell death, may be expected to occur either as a result of local tissue injury, as happens during inflammation, or as the result of regulated secretion mechanisms (Bruzzone et al., 2001). In the scenario of an immune reaction against a pathogen, antigen-specific activated T effector cells, which themselves have shed cell surface ARTs and thus are resistant to NAD-induced cell death (**Fig. 4a**), cause the lysis of target cells, thereby releasing NAD into the extracellular compartment (**Fig. 4b**). Resting bystander cells, which are not specific for the pathogen, but which might become activated due to the multitude of stimulatory signals generated

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

during the inflammatory response, would be eliminated following exposure to NAD and ART2-catalyzed ADP-ribosylation of cell surface target proteins (**Fig. 4c**).

In conclusion, ecto-NAD-induced cell death provides a novel mechanism of focussing an apoptotic signal to a selected population of cells which express appropriate "receptor" molecules that are able to process the signal. These molecules include the ARTs, but also one or more as yet unknown effector molecules that are targets for ADP-ribosylation. It will be a challenge to identify these downstream effectors, and to determine whether NAD-induced cell death also operates outside of the immune system.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chemicals were from Sigma (Deisenhofen, Germany). AnnexinV-FITC, anti-CD3-PE, anti-rat-Ig-PE, and anti-CD3-, -CD28-, and -CD95-antibodies were from Pharmingen (Heidelberg, Germany). ART2.2-specific antibody Nika102 has been described (Koch-Nolte et al., 1999).

Animals and preparation of cells

Six to eight week old BALB/cByJ mice were obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany). Thymi and lymph nodes were isolated from sacrificed animals, and single cell suspensions were prepared and processed for flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson) as described previously (Adriouch et al., 2001). Where indicated, T cells were enriched by depletion of B cells using magnetic cell separation with Dynabead-immobilized goat anti-mouse IgG (Dyna, Hamburg, Germany, 4 –6 beads/cell).

Assay for phosphatidylserine exposure

Apoptotic and necrotic cells were stained with AnnexinV-FITC and propidium iodide essentially as described previously (Adriouch et al., 2001). In brief, following treatment

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

with the indicated concentrations of extracellular ATP or bzATP at 37°C, cells were washed in RPMI medium supplemented with 2mM CaCl₂, and were then stained in this medium for 20 min on ice with FITC-conjugated AnnexinV (1µg/ml) and propidium iodide (10µg/ml) or PE-conjugated anti-mouse IgG.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gudrun Dubberke and Vivienne Welge for expert technical assistance. This work was supported by grant SFB 545/B9 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to FKN and FH, and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. SA is recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

- Adriouch, S., Ohlrogge, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Seman, M. (2001). Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. *J Immunol* **167**, 196-203.
- Anderson, K. L., Anderson, G., Michell, R. H., Jenkinson, E. J., and Owen, J. J. (1996). Intracellular signaling pathways involved in the induction of apoptosis in immature thymic T lymphocytes. *J Immunol* **156**, 4083-4091.
- Bossy-Wetzell, E., and Green, D. R. (2000). Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol* **322**, 15-18.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and De Flora, A. (2001). Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J* **15**, 10-12.
- Debatin, K. M., Suss, D., and Krammer, P. H. (1994). Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection? *Eur J Immunol* **24**, 753-758.
- Glowacki, G., Braren, R., Firner, K., Nissen, M., Kuhl, M., Reche, P., Bazan, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2002). The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* **11**, 1657-1670.
- Greiner, D. L., Handler, E. S., Nakano, K., Mordes, J. P., and Rossini, A. A. (1986). Absence of the RT-6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J Immunol* **136**, 148-151.
- Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Angelillo, M., Nakamura, N., and Rossini, A. A. (1987). Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *J Exp Med* **166**, 461-475.
- Haag, F., and Koch-Nolte, F. (1998). Endogenous relatives of ADP-ribosylating bacterial toxins in mice and men: potential regulators of immune cell functions. *J Biol Reg Homeos Ag* **12**: 53-62..
- Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E. H., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2000). Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* **165**, 4463-4469.

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Ablamunits, V., Leiter, E. H., and Haag, F. (1999). A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol* **163**, 6014-6022.
- Koch-Nolte, F., and Haag, F. (1997). Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Adv Exp Med Biol* **419**, 1-13.
- Liu, Z. X., Azhipa, O., Okamoto, S., Govindarajan, S., and Dennert, G. (2001). Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces T cell apoptosis in vivo and in vitro. *J Immunol* **167**, 4942-4947.
- Ludden, P. W. (1994). Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. *Mol Cell Biochem* **138**, 123-129.
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., and Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825-835.
- Okamoto, S., Azhipa, O., Yu, Y., Russo, E., and Dennert, G. (1998). Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol* **160**, 4190-4198.
- Prochazka, M., Gaskins, H. R., Leiter, E. H., Koch-Nolte, F., Haag, F., and Thiele, H. G. (1991). Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. *Immunogen* **33**, 152-156.
- Thiele, H. G., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (1997). Molecular cloning and characterization of the T-cell mono(ADP-ribosyl)transferase RT6. Relationships to other mADPRTs and possible functions. *Adv Exp Med Biol* **419**, 109-120.
- Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* **280**, 243-248.
- Wang, J., Nemoto, E., and Dennert, G. (1996). Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein. *J Immunol* **156**, 2819-2827.

Haag et al.: NAD-induced apoptosis in T cells

Wang, J., Nemoto, E., Kots, A. Y., Kaslow, H. R., and Dennert, G. (1994). Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase. *J Immunol* **153**, 4048-4058.

LEGENDS TO FIGURES

FIGURE 1. Extracellular NAD induces rapid phosphatidylserine exposure and cell death in T lymphocytes. Purified lymph node T cells were incubated with the indicated concentrations of NAD at 37°C for two hours (*a*) or the indicated times (*b*) before staining with AnnexinV-FITC and propidium iodide.

FIGURE 2. Differential sensitivity of thymocytes and lymph node cells to NAD and anti-CD95 antibodies. Thymocytes and total lymph node cells were incubated for two hours at 37°C with NAD or anti-CD95 antibodies before staining with AnnexinV-FITC and propidium iodide (*a*) or anti-CD3 antibodies (*b*).

FIGURE 3. Activated T cells shed ART2.2 and become resistant to NAD-induced apoptosis. Purified lymph node T cells were incubated for two hours at 37°C with 100ng/ml PMA or 1µg/ml plate-bound anti-CD3/CD28 antibodies. (*a*). Expression of ART2.2 was analyzed by staining with Nika102 followed by anti-rat-Ig-PE. Untreated cells are represented by the shaded histogram, PMA- and anti-CD3-treated cells by bold and dotted lines, respectively. (*b*) Cells as in (*a*) were treated for 30 minutes at 37°C with the indicated concentrations of NAD before staining with AnnexinV-FITC and propidium iodide.

FIGURE 4. NAD-induced apoptosis may control autoimmunity by preventing the activation of bystander cells. See text for details. Extracellular NAD is denoted by red stars, ADP-ribosylation of an unknown target protein by a red triangle.

FIGURE 1

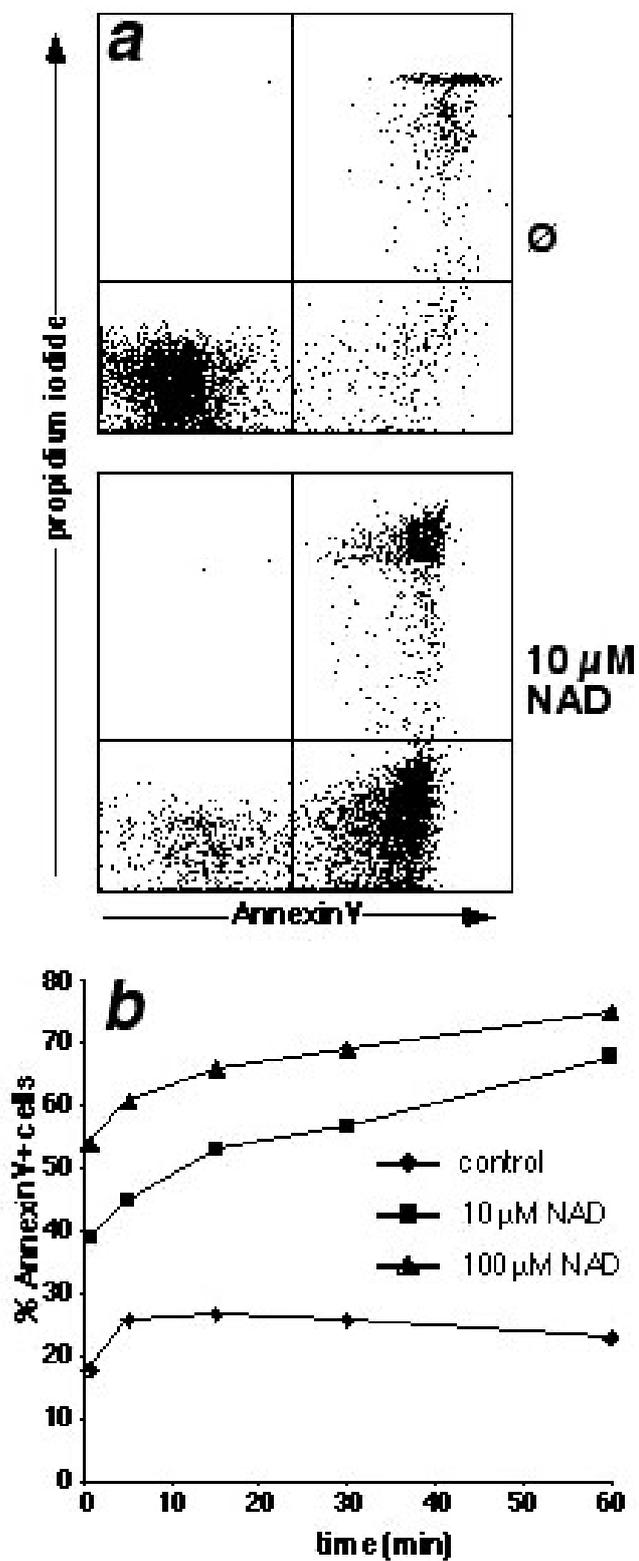


FIGURE 2

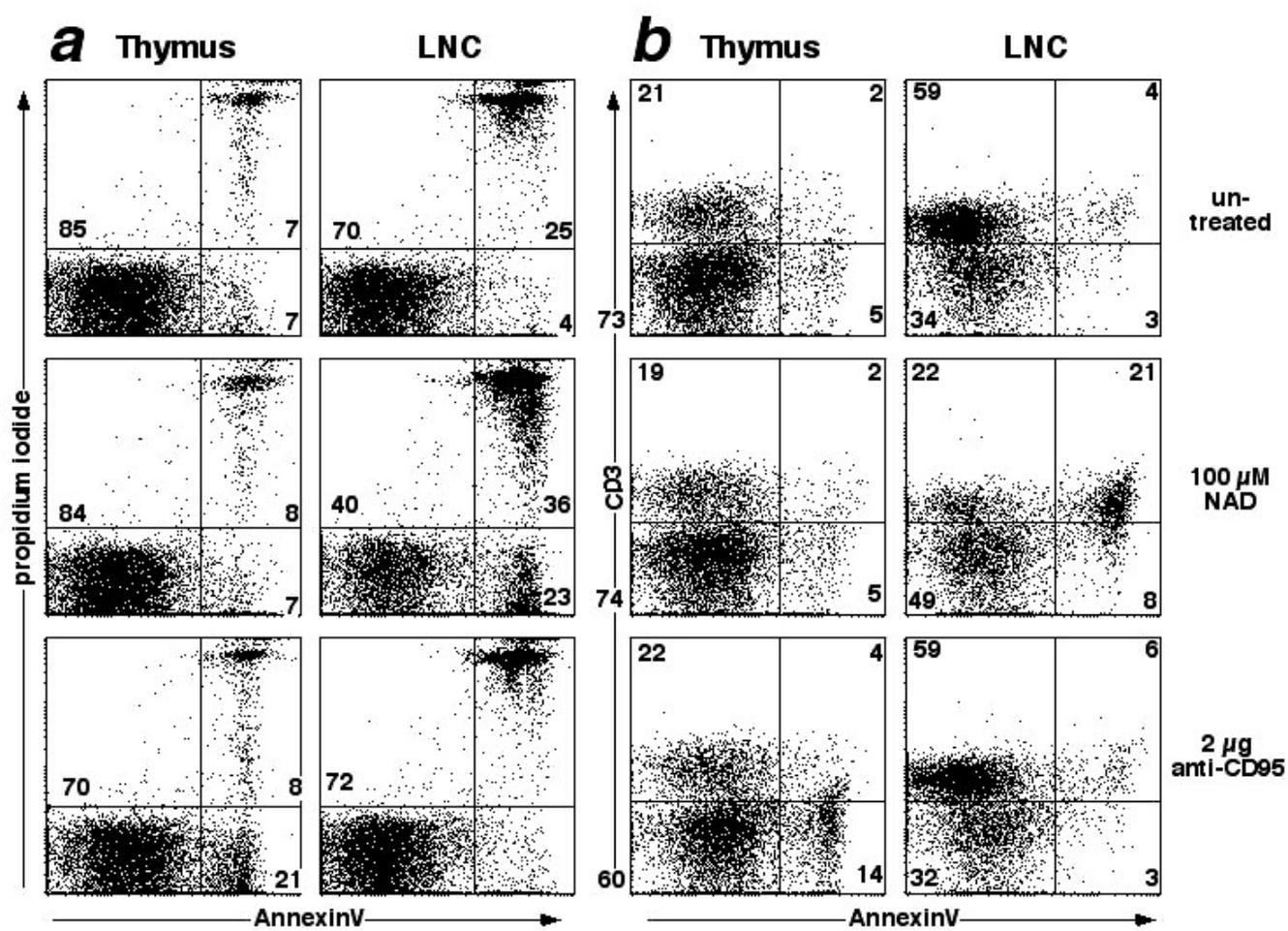


FIGURE 3

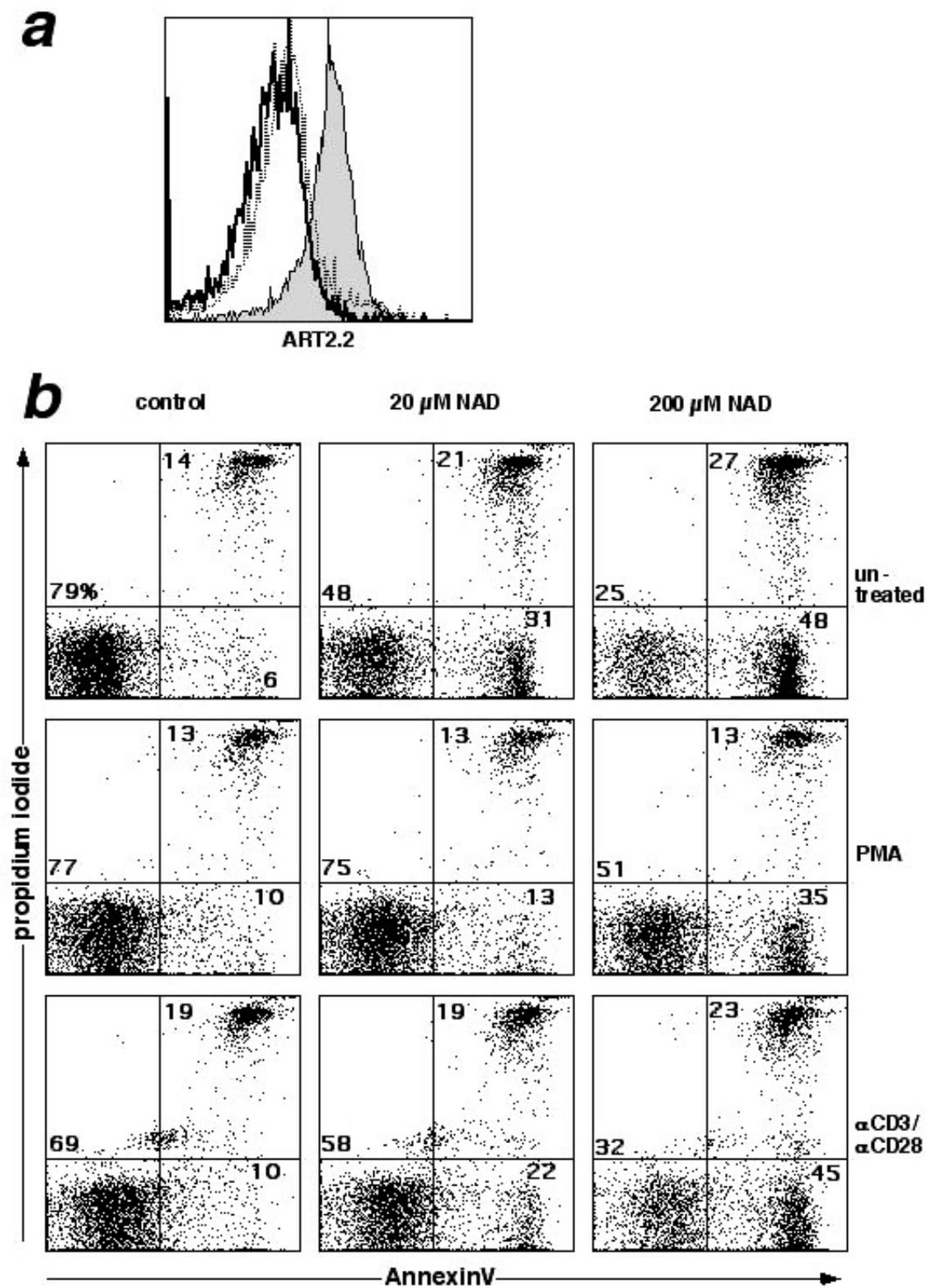
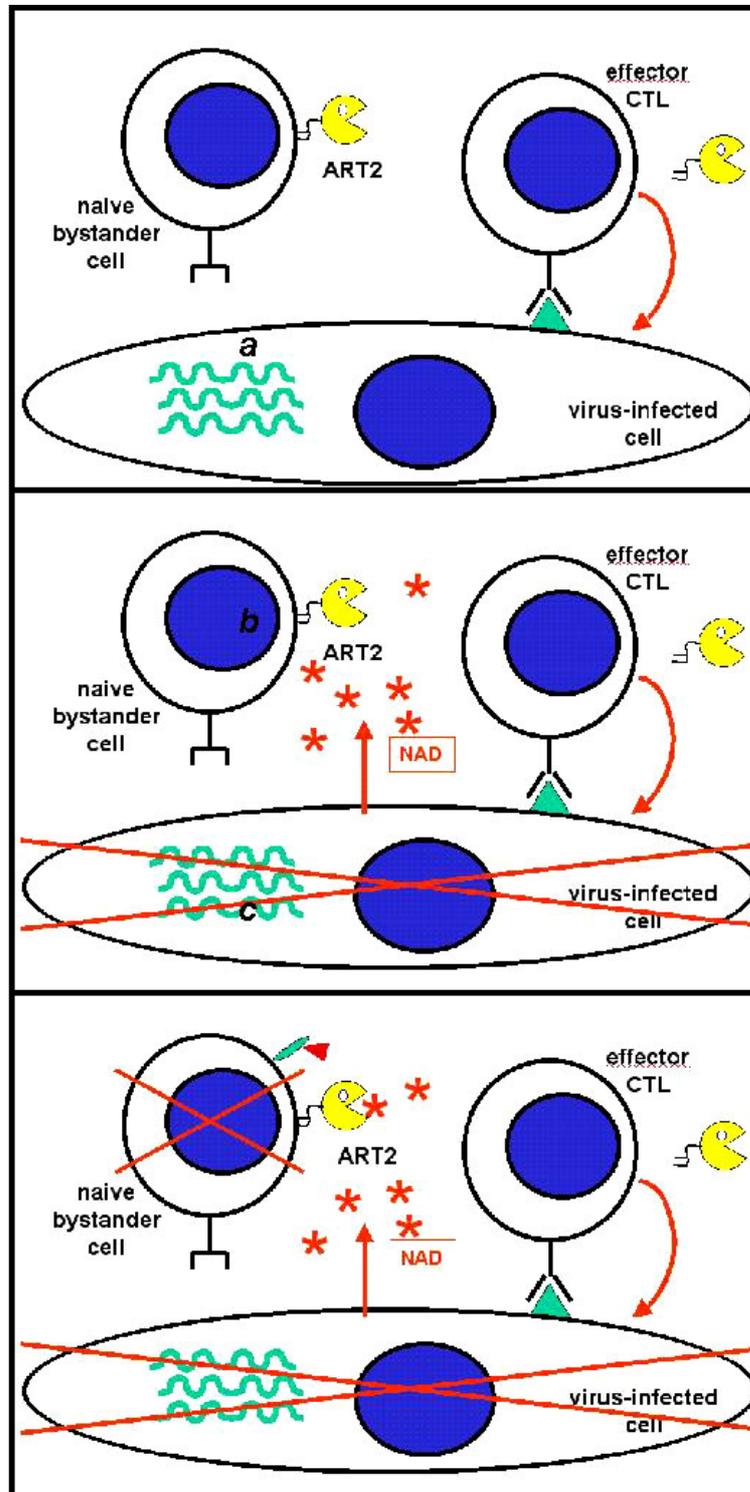


FIGURE 4



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré au cours de ce travail qu'il existe une voie d'activation du récepteur P2X₇ indépendante de l'ATP. Cette voie implique une ecto-enzyme analogue à certaines toxines bactériennes, l'ART2.2, qui utilise le NAD extracellulaire pour catalyser l'ADP-ribosylation de nombreuses protéines membranaires (Article 1). Sur les lymphocytes T murins, l'ADP-ribosylation de ces protéines membranaires induit la stimulation du récepteur P2X₇ et conduit à l'initiation d'un processus apoptotique directement responsable de la toxicité exercé par le NAD sur ces cellules (Article 3). Les effets délétères du NAD sur les lymphocytes T sont en partie contrôlés par la régulation fine de l'expression de l'ART2.2 au cours de leur différenciation. Dans le thymus, seuls les lymphocytes T matures CD3^{High} expriment l'ART2.2 (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1999). Cependant, pour des raisons que nous n'avons pas explorées ces thymocytes sont tout autant insensibles au NAD que les thymocytes immatures qui n'expriment pas l'ART2.2 (Article 4). Une hypothèse serait qu'ils n'expriment pas le récepteur P2X₇. En périphérie, la majorité des lymphocytes T expriment à leur surface l'ART2.2 et P2X₇ et sont sensibles à l'apoptose induite par l'ATP et le NAD (Article 1 et 4). *In vitro*, l'activation de ces lymphocytes matures par la voie du CD3 ou par l'utilisation d'un ester de phorbol stimulant directement les protéines kinases C cytoplasmiques provoque rapidement le clivage de l'ART2.2 par des métalloprotéases de la famille TACE et sa libération subséquente de la surface membranaire (Kahl, S. *et al.*, 2000; Nemoto, E. *et al.*, 1996b). L'activation de ces lymphocytes T conduit, comme on peut donc s'y attendre, à l'acquisition concomitante d'une résistance au NAD (Article 4, et (Liu, Z.X. *et al.*, 2001)). *Ex vivo*, les lymphocytes T périphériques qui y sont résistants expriment des marqueurs d'activations et correspondent vraisemblablement à des cellules récemment activées ou à des cellules mémoires (résultats non publiés). En accord avec cette interprétation, l'expression de l'ART2.2 sur les lymphocytes T semble corrélée positivement avec l'expression de CD62L mais négativement avec l'expression de CD25 et CD38 (Kahl, S. *et al.*, 2000; Koch-Nolte, F.

et al., 1999). Ces résultats, dans leur ensemble, montrent que la sensibilité à l'apoptose induite par le NAD est restreinte aux lymphocytes T matures et quiescents.

La mise en évidence de concentrations élevées de NAD dans les sites inflammatoires induits par le Biogel, nous permet de proposer que le NAD puisse participer à la régulation du système immunitaire *in vivo*. En effet, le NAD libéré par les cellules lésées permettrait d'inhiber sélectivement l'activation des lymphocytes T naïfs sans affecter les fonctions des cellules T pré-activées. Nous pensons que ce mécanisme est susceptible de jouer un rôle dans la prévention de l'activation des lymphocytes T auto-réactifs aux contacts de cellules en souffrance. En accord avec cette hypothèse, les animaux présentant des défauts génétiques affectant l'expression des ART2 manifestent une susceptibilité accrue aux maladies autoimmunes (Ablamunits, V. *et al.*, 2001; Greiner, D.L. *et al.*, 1987; Haag, F. *et al.*, 1993; Koch-Nolte, F. *et al.*, 1995; Prochazka, M. *et al.*, 1991).

L'activation de P2X₇ consécutive à l'ADP-ribosylation de certaines protéines de la membrane des lymphocytes par l'ART2.2 représente une voie originale et inattendue d'activation de ce récepteur dont l'ATP est réputé être le ligand physiologique majeur. Nos études n'ont pas encore permis de mettre en évidence le mécanisme précis par lequel l'ADP-ribosylation conduit à cette stimulation. Il est cependant clair que l'activité de l'ART2.2 ne provoque pas la libération de l'ATP endogène et ne conduit pas à l'activation « autocrine » du récepteur P2X₇. En effet, ce mécanisme est difficilement conciliable avec nos observations montrant que l'addition d'ATPase (apyrase) dans le milieu réactionnel inhibe l'activation du récepteur P2X₇ par l'ATP exogène sans affecter la réponse au NAD. D'autre part, il ressort des expériences avec les cellules HEK transfectées avec P2X₇ que, ni le NAD, ni l'ADPR, ne sont en soi des activateurs de ce récepteur. Enfin, nous avons montré que certains analogues du NAD dont le groupement adénine est modifié, demeurent substrat de l'ART2.2 mais sont incapables d'induire l'apoptose des lymphocytes T (Article 3). Cette observation souligne l'importance du groupement « ADP » ou « ADP-ribose », apporté par l'ADP-ribosylation des protéines par l'ART2.2, nécessaires selon notre modèle à l'activation du récepteur P2X₇. Dans ce cas, deux modèles peuvent schématiquement être proposés. Dans un premier cas, il est possible d'envisager que le récepteur P2X₇ soit lui-même ADP-ribosylé par l'ART2.2 à

proximité du site de fixation de l'ATP. Le groupement ADP-ribose lié de manière covalente au récepteur serait alors capable d'interagir avec ce site de reconnaissance aux ligands et permettrait d'activer directement le récepteur P2X₇ (Figure 9, page 78). Alternativement, il peut être envisagé que le récepteur soit stimulé par le groupement ADP-ribose présenté par une protéine annexe laquelle serait directement une cible de l'ADP-ribosylation (Figure 10, page 79). A l'évidence, cette « présentation » serait plus efficace que l'interaction avec l'ADPR libre, soit pour des raisons d'affinité, soit du fait qu'elle mettrait parallèlement en jeu des interactions protéine-protéine qui auraient des conséquences sur la conformation du récepteur P2X₇.

Il a récemment été démontré dans la lignée cellulaire humaine HEK-293 transfectée avec le gène codant pour la protéine P2X₇ de rat que le récepteur P2X₇ fonctionnel est en fait constitué d'un vaste complexe protéique impliquant au moins 11 autres protéines (Kim, M. *et al.*, 2001). Certaines de ces protéines, associées par l'intermédiaire de liaisons faibles à P2X₇, ont une localisation cytoplasmique et participent probablement à la stabilisation du complexe et à la transduction des signaux (Kim, M. *et al.*, 2001). Cependant, deux protéines membranaires ont également été identifiées : l'intégrine β -2 et une phosphatase (RPTP- β) (Figure 3, page 28). Cette dernière participe d'après les auteurs à la désensibilisation du récepteur. Ces deux protéines membranaires pourraient potentiellement, si elles étaient ADP-ribosylées, présenter de manière efficace le groupement « ADP-ribose » à la protéine P2X₇ avec laquelle elles entretiennent des relations privilégiées. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que des protéines analogues sont effectivement ADP-ribosylées en présence de NAD à la surface des lymphocytes T de souris. En effet, il a été démontré par des expériences d'immuno-précipitation que l'intégrine β -2 (CD18), constituant de l'hétérodimère LFA-1, ainsi que la phosphatase CD45 sont toutes deux ADP-ribosylées lorsque les lymphocytes T sont incubés en présence de NAD (Nemoto, E. *et al.*, 1996b; Okamoto, S. *et al.*, 1998). Il serait intéressant de savoir si, dans les lymphocytes T de souris, ces protéines ADP-ribosylées font également partie d'un complexe protéique comprenant la protéine P2X₇ similaire à celui décrit dans le modèle cellulaire HEK-293. L'accès à ces données importantes concernant l'identité des protéines qui interagissent avec la protéine P2X₇ est pour le moment entravé par le manque d'anticorps susceptibles de reconnaître et d'immunoprécipiter P2X₇ chez la souris.

Des tentatives pour mettre au point de tels anticorps sont actuellement en cours, en collaboration avec l'équipe de F. Koch-Nolte à Hambourg. De tels outils permettraient également de vérifier si la protéine P2X₇ peut elle-même constituer une cible directe de l'ADP-ribosyl transférase. Pour le moment, en se basant sur la séparation bidimensionnelle des protéines ADP-ribosylées, nos résultats préliminaires semblent indiquer que P2X₇ ne serait pas ADP-ribosylé.

1. Le groupement ADP-ribose transféré sur les protéines membranaires peut-il se comporter comme un agoniste du récepteur P2X₇ ?

Selon nos hypothèses, le groupement ADP-ribose transféré de manière covalente sur certaines protéines membranaires ou sur la protéine P2X₇ elle-même serait susceptible d'accéder au site de reconnaissance du récepteur P2X₇ et stimulerait ainsi son activité comme le ferait l'ATP. Cette hypothèse implique, de manière sous-entendue, que tout ou partie du groupement « ADP-ribose » porté par l'une des arginines de la protéine modifiée puisse se comporter comme un agoniste du récepteur P2X₇. Nos résultats montrent cependant que ni l'ADP ni l'ADP-ribose, utilisés à la concentration de 1 mM, ne sont capables de reproduire les effets obtenus avec le NAD sur les lymphocytes T (Article 1 et 3). Il est également remarquable que le NAD lui-même, contenant le groupement « ADP-ribose », ne provoque aucun effet apparent sur les lymphocytes T des souris ART2.2^{-/-} et paraît donc incapable de stimuler de manière directe le récepteur P2X₇ (Article 3). Cependant, il est important de noter que sur le plan méthodologique les expériences que nous avons réalisées ne permettent pas d'évaluer de manière directe les effets éventuels de ces molécules sur la stimulation *sensu stricto* du récepteur P2X₇ et sur l'ouverture subséquente du canal cationique. Nous avons en effet mesuré leur capacité à induire l'exposition des phosphatidylsérines à la surface des lymphocytes en considérant cet événement comme critère de stimulation efficace de ce récepteur. En d'autres termes, nos résultats ne permettent pas d'exclure un effet agoniste faible de l'ADP-ribose ou de l'ADP sur le récepteur P2X₇ mais montrent cependant que ces molécules sont incapables, à la concentration de 1 mM, d'induire les événements secondaires

caractéristiques de la stimulation de ce récepteur par l'ATP, le BzATP et certains autres agonistes (Article 2). En revanche, certaines données de la littérature montrent qu'en utilisant des techniques plus sensibles il est possible de mesurer un effet agoniste faible de l'ADP sur le récepteur P2X₇ (Surprenant, A. *et al.*, 1996). La technique employée est basée sur la mesure des modifications du potentiel membranaire résultant de l'ouverture de canaux ioniques qui, dans ce cas, reflète directement l'activation du récepteur P2X₇ (technique d'électrophysiologie dite de « patch-clamp »). Cette étude réalisée sur les cellules de la lignée HEK-293 transfectées par le gène codant pour ce récepteur, montre que l'ADP, à concentration saturante (1 à 2 mM), induit une réponse faible qui n'excède pas 20% de la réponse maximale induite par l'ATP. Ces résultats suggèrent donc que l'ADP possède bel et bien un effet agoniste partiel sur le récepteur P2X₇. Il n'existe en revanche aucune information dans la littérature sur les effets agonistes éventuels de l'ADP-ribose. Quoi qu'il en soit, les effets même partiels de l'ADP nous permettent de proposer que l'ADP-ribosylation fournisse des groupements « ADP » liés de manière covalente sur certaines protéines membranaires et susceptibles de promouvoir l'activation du récepteur P2X₇. Si tel est le mécanisme mis en jeu, on peut se demander comment ce groupement « ADP » formé à partir du NAD parvient à stimuler de manière si efficace l'induction de l'exposition des phosphatidylsérines à la surface membranaire alors que l'ADP soluble, agoniste partiel du récepteur P2X₇, en est incapable. Une autre question se pose : comment expliquer que le NAD stimule indirectement le récepteur P2X₇, par l'intermédiaire de l'ADP-ribosylation des protéines membranaires, à des concentrations de l'ordre de 1 μM alors que les concentrations d'ATP ou d'ADP nécessaires pour activer directement ce récepteur sont au moins 100 fois supérieures ? Les éléments de réponse qui peuvent être envisagés tiennent, en partie, à la nature covalente de ce groupement particulier. L'ADP-ribosylation des protéines membranaires fournit, en effet, un groupement « ADP » lié de manière covalente et disponible à proximité immédiate du récepteur P2X₇. La concentration apparente de ce groupement chimique peut, dans ces conditions, atteindre des valeurs locales bien supérieures aux concentrations d'ADP soluble utilisé dans les tests *in vitro*. Cette concentration apparente sera d'ailleurs plus importante encore si la protéine P2X₇ est elle-même ADP-ribosylée ou si la protéine annexe qui est ADP-ribosylée interagit avec elle au sein du complexe multi-protéique qui forme le récepteur P2X₇ fonctionnel. Ce premier point permet probablement de rendre compte du fait que le NAD est actif à des concentrations

100 fois moins importantes que celles nécessaires à la stimulation du récepteur par l'ATP. En second lieu, il est possible que le groupement « ADP » lié de manière covalente aux protéines membranaires puisse interagir plus longuement avec le site de reconnaissance des ligands que ne le ferait l'ADP soluble. Dans le cas des molécules solubles, le temps d'interaction est en partie déterminé par l'affinité du ligand, c'est à dire par la force des liaisons faibles qui stabilisent de manière transitoire le ligand dans le site de reconnaissance. Dans le cas où le ligand est lié de manière covalente, l'affinité apparente de l'interaction qui s'établit entre ces deux partenaires moléculaires peut être modifiée du fait de la contrainte supplémentaire exercée par la liaison covalente sur la mobilité du ligand. De plus, dans le cas où l'ADP-ribosylation ne concernerait pas la protéine P2X₇ mais une protéine annexe, toute interaction entre ces deux protéines serait de nature à stabiliser le groupement ADP ainsi présenté au site de reconnaissance. Ces facteurs qui contribuent en théorie à la stabilisation de l'interaction entre le groupement « ADP » et le site de reconnaissance sont susceptibles d'améliorer son potentiel agoniste. Ces facteurs pourraient ainsi rendre compte de l'efficacité avec laquelle l'ADP-ribosylation des protéines membranaires provoque l'exposition des phosphatidylsérines à la surface membranaire, en apparente contradiction avec l'inactivité de l'ADP ou de l'ADP-ribose libres.

2. Existe-t-il un second site de fixation des ligands sur le récepteur P2X₇ ?

Les protéines de type P2X possèdent seulement 2 domaines trans-membranaires ce qui ne leur permet pas, en tant que monomères, de former un canal ionique. L'association de trois de ces protéines semble nécessaire à la formation d'un récepteur P2X fonctionnel (Nicke, A. *et al.*, 1998). Chacune des protéines P2X formerait ainsi l'une des trois sous unités du récepteur. Cet ensemble homotrimérique posséderait donc plusieurs sites de reconnaissance des ligands. Une étude récente suggère que le récepteur P2X₇ possède deux sites d'activation, fonctionnellement différents, dont le K_d pour l'ATP diffère d'un facteur 50 (Klapperstuck, M. *et al.*, 2001). L'hypothèse la plus simple pour rendre compte de cette observation consisterait

à envisager l'existence sur chacune des sous-unité de deux sites indépendants présentant chacun une affinité différente pour l'ATP. Cependant, cette n'étude n'exclut pas l'éventualité que le site de faible affinité découle d'un changement conformationnel d'un seul et même site. Dans ce cas, la fixation de l'ATP sur l'un des sites de l'homotrimère induirait un changement conformationnel de nature à affecter l'affinité pour l'ATP des sites voisins (régulation allostérique négative). Une autre étude plus récente montre que le pré-traitement du récepteur P2X₇ par l'ATP pendant 10 secondes stimule fortement la sensibilité du récepteur pour l'ADP (Chakfe, Y. *et al.*, 2002). La sensibilisation par une dose unique et brève d'ATP (0,1 à 1 mM pendant 10 sec) permet d'obtenir une réponse secondaire avec l'ADP pouvant atteindre 85% de la réponse maximale obtenue avec l'ATP. Le temps pendant lequel le récepteur demeure significativement sensibilisé a été estimé par ces auteurs aux alentours de 3 min. Cependant, la formation d'un large pore membranaire normalement engendré lors d'une stimulation soutenue des récepteurs par l'ATP ne semble pas pouvoir être reproduite par l'ADP, même si les récepteurs ont préalablement été sensibilisés par l'ATP. Quel que soit l'état de sensibilité du récepteur, la réponse à l'ATP reste donc différente de la réponse induite par l'ADP.

Dans notre modèle, nous montrons que le récepteur P2X₇ peut aussi bien être activé par l'ATP que par l'ADP-ribosylation des protéines membranaires. Compte tenu de la différence entre les groupements chimiques qui activent le récepteur dans ces deux situations, la question du nombre de sites distincts présents sur ce récepteur peut légitimement être posée. En s'inspirant de l'étude précédemment citée, nous avons testé si le NAD, utilisé à des doses sub-optimales, était capable de sensibiliser le récepteur vis à vis de la réponse à l'ATP et inversement. Nos résultats n'ont montré aucune synergie apparente entre ces deux voies qui paraissent complètement indépendantes (résultats non publiés). Cependant, la méthode que nous avons employée repose là encore sur la mesure indirecte de l'induction de l'exposition des phosphatidyl-sérines à la surface des cellules conséquent à l'activation soutenue des récepteurs P2X₇. Une méthode de mesure plus directe de l'activité du récepteur, en électrophysiologie par exemple, serait plus appropriée pour examiner ces hypothèses. Un autre de nos résultats suggère une indépendance entre les deux voies d'activation du récepteur. L'etheno-ADP-ribosylation des protéines membranaires loin d'induire l'apoptose des lymphocytes protège des effets du NAD (Article 3). Malgré l'inhibition ainsi exercée sur

l'activation du récepteur P2X₇ par la voie du NAD, ce traitement est sans effet sur la voie de l'ATP (résultats non publiés). L'éthéno-ADP-ribosylation ne semble donc pas entraver l'accès de l'ATP au site de liaison. Dans le cas où le récepteur P2X₇ serait lui-même ADP-ribosylé à proximité d'un site unique de reconnaissance des ligands, on aurait dû s'attendre à ce que l'éthéno-ADP-ribosylation limite l'accessibilité de ce site à l'ATP soluble. Ces observations militeraient plutôt en faveur de la présence d'un second site indépendant. Toutefois, ne sachant si l'ADP-ribosylation concerne directement ce récepteur ou une protéine annexe, il reste difficile de privilégier cette hypothèse. Enfin, le dernier argument que nous présenterons ici concerne l'oATP. Cet analogue de l'ATP inhibe la fonction du récepteur en se liant de manière irréversible au site de reconnaissance du récepteur (North, R.A. *et al.*, 2000). Le pré-traitement avec cet antagoniste inhibe l'exposition des phosphatidyl-sérines et la formation du pore membranaire induite tant par l'ATP que par le NAD (Article 3 et résultats non publiés). Ce point constitue d'ailleurs l'un des arguments forts démontrant l'implication du récepteur P2X₇ dans les effets du NAD. Cette observation est difficilement conciliable avec l'hypothèse de l'existence de deux sites distincts sur le récepteur dont l'un serait plutôt sensible à la « voie de l'ATP » et l'autre à la « voie du NAD ». Cependant cette éventualité ne peut être définitivement écartée car il reste possible que l'oATP puisse indifféremment se loger dans ces deux sites potentiels.

Ces quelques éléments illustrent la complexité des mécanismes régulant l'activité du récepteur P2X₇. Une meilleure compréhension de la dynamique de ce récepteur nécessiterait certainement une meilleure connaissance de sa stœchiométrie, la détermination du nombre de sites de liaison aux ligands portés par le complexe fonctionnel et surtout l'étude des mécanismes régulant sa sensibilisation et sa désensibilisation.

3. Les implications de la mutation P451L sur le fonctionnement du récepteur P2X₇

Nous avons montré qu'une mutation ponctuelle P451L du récepteur P2X₇ affecte chez C56BL/6 la réponse à l'ATP. Les lymphocytes T des souris C57BL/6 répondent plus faiblement à l'ATP tant en terme de génération d'un influx calcique, que de la stimulation de la formation du pore membranaire ou de l'induction de l'exposition des phosphatidylsérines à la surface cellulaire (Article 2). Cette mutation est située dans la partie cytoplasmique du récepteur P2X₇ connue pour participer à la transduction des signaux et à la formation du large pore membranaire suite à la stimulation prolongée du récepteur par l'ATP (Surprenant, A. *et al.*, 1996). De plus, cette mutation se trouve dans une région qui interagit vraisemblablement avec certaines protéines cytoplasmiques. Des homologies existent en effet entre cette région de la protéine et le domaine engagé dans le recrutement des protéines effectrices impliquées dans l'apoptose en aval du récepteur au TNF (TNFR1 death domain). Cette région cytoplasmique contient aussi une séquence homologue à celle connue pour interagir avec les domaines de type SH3 présente dans la protéine SH3BP1 (Article 2 et (Denlinger, L.C. *et al.*, 2001)). La proline en position 451 est conservée dans chacune de ces régions homologues ainsi que dans la séquence des protéines P2X₇ orthologues de l'Homme et du rat. Ceci nous incite à postuler que cette proline en position 451 est importante pour la conformation de cette région et/ou qu'elle est impliquée dans l'interaction avec des protéines cytoplasmiques possédant un domaine SH3. Les études protéomiques ont permis de caractériser 11 protéines complexées à la protéine P2X₇ dans la lignée cellulaire HEK-293 transfectée par le gène du P2X₇ de rat (Kim, M. *et al.*, 2001). Deux d'entre elles, les protéines PI4K et MAGuK possèdent un domaine SH3 et sont susceptibles d'interagir avec la région cytoplasmique de la protéine P2X₇ autour de la position 451. Il serait donc intéressant de vérifier si des protéines analogues interagissent avec la protéine P2X₇ dans les lymphocytes T murins. La comparaison entre les données obtenues chez C57BL/6 et BALB/c permettrait également de contrôler si l'une ou l'autre de ces protéines n'interagit plus avec le récepteur muté. Cette approche permettrait ainsi d'identifier l'une des protéines qui participe à la génération des nombreux signaux en aval du récepteur P2X₇ et/ou à la stabilisation du vaste complexe

protéique. De telles informations pourraient permettre de mieux comprendre le fonctionnement de ce récepteur aux effets multiples.

Certaines données de la littérature montrent des différences fonctionnelles importantes entre le récepteur P2X₇ de souris et ceux de l'Homme ou du rat (Hibell, A.D. *et al.*, 2000; Hibell, A.D. *et al.*, 2001). La découverte de la mutation P451L et de ses conséquences fonctionnelles permet de reconsidérer ces études sous un jour nouveau. En effet, nombres de ces travaux ont été menés sur des cellules transfectées par un gène qui porte la mutation P451L (Chessell, I.P. *et al.*, 1998; Hibell, A.D. *et al.*, 2000; Hibell, A.D. *et al.*, 2001). Une réévaluation de la fonctionnalité du récepteur murin normal et sa comparaison avec les récepteurs exprimés chez l'Homme et le rat semble donc nécessaire. Il est probable que certaines différences entre espèces subsisteront car les récepteurs orthologues ne présentent que 80 à 85% d'homologie entre eux. Ces différences dans la séquence primaire peuvent notamment rendre compte des sensibilités inégales aux agonistes et aux antagonistes qui ont été observées (Rassendren, F. *et al.*, 1997). Cependant, d'après nos observations relatives aux effets de la mutation P451L, il est vraisemblable que le récepteur murin normal soit plus proche de celui des autres espèces que ce qu'il a été rapporté jusqu'à présent. Dans ce cas, l'étude des fonctions de ce récepteur dans le modèle plus accessible de la souris garderait une certaine justification. Nos observations suggèrent également de réévaluer le phénotype des souris dont le gène P2X₇ a été invalidé par recombinaison homologue. En effet, ces souris sont maintenues sur un fond génétique C56BL/6 ou DBA/2 dont nous savons qu'ils portent la mutation P451L. De ce fait, les effets de l'invalidation du gène sont probablement sous estimés chez les souris déficientes puisque leur phénotype est comparé à celui de parents porteurs de la mutation P451L affectant la fonctionnalité du récepteur (Sikora, A. *et al.*, 1999; Solle, M. *et al.*, 2001).

Il est par ailleurs important de souligner que la mutation P451L affecte non seulement la sensibilité à l'ATP mais aussi celle du récepteur P2X₇ au NAD. En effet, les lymphocytes T issus de souris C57BL/6 sont résistants à l'apoptose induite par le NAD (Article 1 et 3). Cette observation confirme en soi l'implication du récepteur P2X₇ dans les effets du NAD. Il est

cependant intéressant de noter que les effets de la mutation P451L sont plus prononcés dans la voie du NAD que dans celle de l'ATP. La réponse calcique du récepteur muté à l'ATP ne représente que 30 à 40 % de celle du récepteur normal, mais reste détectable. En revanche, la réponse induite par le NAD sur les lymphocytes T de C57BL/6 est à peine distinguable du bruit de fond (Article 1 et Article 3). Les causes de cette différence ne sont pas claires. Cependant, il est possible d'imaginer qu'elle tienne à une plus faible efficacité de stimulation du récepteur P2X₇ par la voie du NAD, comme nous l'avons suggéré précédemment, même si cette stimulation intervient à des doses plus faibles qu'avec l'ATP. Ainsi, la mutation pourrait avoir un effet plus marqué sur l'activation du récepteur par des agonistes partiels. Cette interprétation est soutenue par l'absence de réponse aux agonistes faibles que sont le β,γ -ATP et le MeSATP chez la souris C57BL/6 (Article 2). Il reste toutefois possible que d'autres facteurs inconnus influencent la réponse au NAD chez C57BL/6.

4. Comparaison des voies d'activation de P2X₇ par le NAD et l'ATP

L'incubation des lymphocytes T avec le NAD ou avec l'ATP n'engendre pas des effets complètement superposables. Bien que ces deux voies convergent vers la stimulation du récepteur P2X₇, la réponse biologique diffère quelque peu et semble refléter un niveau de stimulation du récepteur plus faible lorsqu'il s'agit du NAD. En effet, en prenant la formation du pore membranaire (mesurée par l'incorporation de la molécule YO-PRO-1) comme critère d'activation soutenue du récepteur P2X₇, il apparaît qu'à saturation, le NAD induit un effet significativement plus faible que l'ATP (Article 3). La permissivité au YO-PRO-1 induite par l'ATP est d'ailleurs elle-même moins importante que celle engendrée par le BzATP, molécule synthétique dont le potentiel agoniste est supérieur à celui de l'ATP. La situation est analogue en ce qui concerne l'induction d'un flux calcique. De même, si l'on compare la toxicité induite par ces molécules, mesurée par l'incorporation de l'iodure de propidium, il apparaît là encore que les effets du NAD sont moins prononcés que ceux de l'ATP. L'incubation des lymphocytes T avec une concentration saturante d'ATP induit une toxicité qui affecte l'ensemble des cellules dans les 30 min qui suivent l'incubation. En revanche, la toxicité

induite par le NAD après 30 min d'incubation n'affecte guère plus de 20% des lymphocytes T qui y sont sensibles (Article 3). Les lymphocytes T traités par le NAD demeurent plus longtemps dans un état qui peut être considéré comme intermédiaire où les cellules exposent à la surface cellulaire leur phosphatidyl-sérine, détectable par l'annexinV, sans incorporer l'iodure de propidium. Sur ces critères, la stimulation du récepteur par l'ADP-ribosylation des protéines membranaires paraît donc moins intense que celle engendrée par l'ATP. Il serait sans doute intéressant de valider cette conclusion en électrophysiologie. Cette conclusion, si elle se vérifiait, serait en accord avec l'hypothèse précédemment énoncée selon laquelle le récepteur P2X₇ serait activé, dans la voie du NAD, par le groupement « ADP » fourni par l'ADP-ribosylation des protéines membranaires. L'ADP, agoniste partiel de ce récepteur, demeurerait incapable de reproduire les effets obtenus avec de meilleurs agonistes et cela même lorsque ce groupement se trouverait lié de manière covalente à la surface membranaire. Cependant, malgré son efficacité plus faible, la signalisation passant par le NAD devrait perdurer dans le temps du fait de la nature covalente de l'ADP-ribosylation. Nos résultats sont en accord avec cette idée puisque l'incubation des lymphocytes T avec du NAD pendant seulement 5 min induit une exposition des phosphatidylsérines à la surface membranaire qui perdure pendant au moins les 200 premières minutes après élimination du NAD (Article 3). A cet égard, il n'est pas inutile de rappeler que des phospho-diesterases semblent également présentes à la surface. Ces enzymes enlèvent rapidement des groupements ADP ou AMP sur une partie des protéines ADP-ribosylés, ne laissant que des groupements arginine-ribose ou arginine-phosphoribose qui ne peuvent probablement pas intervenir directement dans l'activation du récepteur P2X₇ (Kahl, S. *et al.*, 2000; Nemoto, E. *et al.*, 1996a). Il est donc remarquable de constater que la signalisation initiée par le NAD perdure malgré l'existence de ces phospho-diesterases. Ceci est en accord avec le fait que certaines protéines, telle que la chaîne α de la molécule d'adhésion LFA-1, demeurent ADP-ribosylées 6h après le retrait du NAD (Nemoto, E. *et al.*, 1996b). En revanche, l'exposition des groupements PS induite par l'ATP dans les mêmes conditions se résorbe complètement dans les 60 minutes qui suivent le retrait de ce composé. En d'autres termes, contrairement à l'ATP un contact bref avec le NAD induit une exposition irréversible des phosphatidylsérines à la surface cellulaire.

Les effets transitoires induit par l'ATP avaient d'ailleurs été auparavant observés sur des lignées de macrophages (MacKenzie, A. *et al.*, 2001). Dans ce modèle, les auteurs avaient montré que la stimulation brève du récepteur P2X₇ induit la libération de microvésicules membranaires (« blebbing ») et participent à la sécrétion de l'IL-1 β qui est dépourvue de signal d'adressage vers les voies de sécrétion classiques. Cette étude suggérait aussi que l'apparition des groupements phosphatidylsérines à la surface cellulaire témoigne de la réorganisation active du cytosquelette plutôt que de l'engagement vers un processus d'apoptose. Ces observations relancent la question de la signification biologique de l'apparition des phosphatidylsérines considérée peut être à tort comme un marqueur de l'engagement cellulaire vers un processus apoptotique. Les effets réversibles de l'ATP suggèrent que la perte de l'asymétrie membranaire détectable par l'annexinV ne constitue vraisemblablement pas une étape décisive conduisant irrévocablement à la mort cellulaire. Une étude récente a d'ailleurs suggéré que la perte de l'asymétrie membranaire précède l'engagement définitif vers l'apoptose (Hammill, A.K. *et al.*, 1999). Dans ce contexte, la question se pose de savoir si le NAD induit réellement un processus que l'on peut qualifier d'apoptose. Cette question est d'autant plus pertinente que la perte de l'asymétrie membranaire induite par le NAD ne suit pas la cinétique classique observée dans les processus apoptotiques. En effet, l'induction de la mort cellulaire programmée par des signaux bien caractérisés tels que celui passant par la voie du récepteur FAS, ne provoque l'exposition des phosphatidylsérines que 6 h après l'engagement de ce récepteur (Ju, S.T. *et al.*, 1999; Krammer, P.H., 2000). Ce délai contraste avec la rapidité (5min) avec laquelle ce même processus est induit par le NAD (Article 3). Toutefois, malgré la difficulté à interpréter la signification biologique de la perte de l'asymétrie membranaire, une toxicité est indéniablement engendrée dès 90 minutes après l'ajout de NAD. D'autre part, l'utilisation de la technique TUNEL a permis de déceler une fragmentation de l'ADN, caractéristique de l'apoptose, 6 heures après l'addition du NAD (Article 1). Globalement ces résultats suggèrent que la toxicité induite par le NAD implique bel et bien un processus apoptotique même si la signification biologique de l'exposition des phosphatidylsérines à la surface cellulaire demeure controversée. L'existence d'un récepteur spécifique des phosphatidylsérines facilitant la phagocytose des cellules qui exposent ces phospholipides à leur surface a été récemment mise en évidence sur les macrophages (Fadok, V.A. *et al.*, 2000; Fadok, V.A. *et al.*, 1992). Ce

mécanisme laisse présager que dans un contexte physiologique les lymphocytes T rencontrant des concentrations de NAD supérieures au micro-molaire soient rapidement détectés par les macrophages. Dans ce cas, il serait possible que ces lymphocytes meurent phagocytés par les macrophages plutôt que d'apoptose.

5. Les sources et les concentrations de NAD *in vivo*

Nos observations montrent que le NAD induit la mort des lymphocytes T murins en activant le récepteur P2X₇. L'étude de la sensibilité au NAD des lymphocytes T au cours des différentes étapes de leur différenciation a permis de découvrir que seuls les lymphocytes T matures et quiescents sont affectés par la présence du NAD (Article 4). Les lymphocytes T thymiques immatures et les lymphocytes T périphériques ayant été activés sont insensibles à ses effets (Article 4 et résultats non publiés). La découverte de cette nouvelle voie de régulation de l'activité des lymphocytes T naïfs soulève la question de son rôle physiologique. Toutefois, le NAD ne peut avoir un rôle *in vivo* qu'à la condition que des concentrations au moins égales au micro-molaire puissent être localement atteintes. Dans le sérum, le NAD est présent à une concentration faible de l'ordre de 0.1 μM (Kim, U.H. *et al.*, 1993). Cependant, les concentrations intracellulaires sont environ 10 000 fois supérieures et peuvent être libérées au voisinage de cellules lésées. Cette hypothèse a été testée dans le modèle inflammatoire induit par l'injection de billes de polyacrylamides (Stiffel, C. *et al.*, 1990). Dans ce modèle, nous avons pu montrer que des concentrations de 10 μM peuvent être atteintes 12h après l'injection de ce Biogel (manuscrit en préparation). Une concentration comprise entre 1 et 3 μM se maintient ensuite pendant encore 4 jours avant de s'affaiblir progressivement du fait de l'arrivée des macrophages qui expriment la NAD-glycohydrolase CD38. Ces résultats montrent pour la première fois que des concentrations de NAD supérieures au micro-molaire peuvent effectivement être atteintes dans un contexte physiologique autour de cellules lésées. Toutefois, pour imaginer que le NAD puisse réguler l'activité des lymphocytes T *in vivo*, il est nécessaire que ces cellules se trouvent dans l'environnement immédiat de la lésion où la concentration de NAD peut atteindre des valeurs suffisantes. Dans ce modèle inflammatoire, très peu de lymphocytes T sont détectés dans le site inflammatoire après 48 h. L'une des

hypothèses qu'il est possible d'avancer, est que la concentration élevée de NAD présente durant le développement de l'inflammation empêche l'accumulation des lymphocytes T en favorisant leur mort par apoptose. Cependant, les expériences préliminaires que nous avons menées sur les souris dont les gènes codant pour l'ART2.1 et l'ART2.2 ont été invalidés ne corroborent pas cette hypothèse. En effet, bien que les lymphocytes T issus de ces souris soient résistants à l'apoptose induite par le NAD, aucune augmentation significative de la quantité de cellules T dans le site inflammatoire n'a pu être mesurée. Dans ce modèle d'inflammation aiguë, qui, rappelons le, est immunologiquement neutre, il semble plutôt que les cellules T ne soient pas recrutées en nombre important au site inflammatoire. Des expériences complémentaires devraient nous permettre de vérifier si, chez les souris déficientes, une accumulation plus importante de cellules T est visible dans une situation d'inflammation chronique après introduction d'un antigène ou d'une bactérie.

6. Relation entre les ART2 et les maladies autoimmunes

Les premières indications sur le rôle des ART2 *in vivo* ont été initialement fournies par l'étude de rats spontanément atteints d'un diabète insulino-dépendant. La comparaison systématique de cette lignée génétiquement prédisposée au diabète avec une lignée dérivée résistante a permis de montrer des différences importantes dans le niveau d'expression de l'ART2 sur les lymphocytes T. La lignée prédisposée se caractérise par l'absence quasi totale de lymphocytes T exprimant l'ART2 alors que 70% des lymphocytes expriment cette enzyme chez les rats normaux (Greiner, D.L. *et al.*, 1987; Haag, F. *et al.*, 1993). Les auteurs de ces études avaient proposé l'existence d'une relation entre l'expression de cette enzyme sur les lymphocytes T et la prédisposition à cette maladie autoimmune. Cette hypothèse a, par la suite, également été mise en avant dans le modèle de la souris NOD, elle aussi déficiente dans l'expression des ART2 (Ablamunits, V. *et al.*, 2001; Prochazka, M. *et al.*, 1991). Enfin, chez les souris (NZWxNZB)F1 considérées comme un modèle murin du lupus érythémateux, le niveau d'expression des ART2 lymphocytaires est également anormalement bas (Koch-Nolte, F. *et al.*, 1995). Dans ce modèle, il a été proposé que le défaut d'expression des ART2,

transmis par le parent NZW, amplifie la prédisposition génétique aux maladies autoimmunes du parent NZB qui produit spontanément divers anticorps auto-réactifs. Ainsi, bien que dans tous ces modèles d'autres facteurs génétiques participent assurément à la prédisposition, l'absence des ART2 semble contribuer au développement de l'auto-immunité.

Dans ce contexte, et sur la base de nos observations *in vitro* sur les effets du NAD au travers de l'ART2.2, nous avons suggéré que le NAD participe à la prévention des maladies autoimmunes et au maintien de la tolérance périphérique. Le NAD, comme on l'a vu, n'affecte que les lymphocytes T quiescents et reste sans effets sur les lymphocytes activés. Nous proposons donc que le NAD libéré dans le site inflammatoire, propice à la stimulation de cellules auto-réactives, puisse prévenir l'activation des cellules T naïves. Seuls les lymphocytes T activés dans les ganglions lymphatiques drainant le site inflammatoire seraient, selon notre hypothèse, capables de subsister dans ce site après avoir perdus les ART2 du fait de l'activation de métallo-protéases. Ce modèle permettrait de rendre compte de la relation qui semble exister entre le défaut des ART2 et la susceptibilité aux maladies autoimmunes. Toutefois, les études préliminaires sur les souris dont les gènes codant pour l'ART2.1 et l'ART2.2 ont été invalidés ne montrent aucune progression spontanée vers une quelconque pathologie auto-immune (Ohlrogge, W. *et al.*, 2002). Le défaut de ces enzymes ne constitue vraisemblablement pas un facteur de progression spontané vers ce type de pathologie dans les conditions standard d'élevage de ces animaux. Notre hypothèse suggère que le NAD ne participerait qu'à la prévention de cette progression lorsque s'installent des conditions propices à l'auto-réactivité telles que les situations inflammatoires. Elle pourra être testée dans différents modèles comme l'EAE, l'arthrite induite par le collagène ou la myosite inflammatoire (Constantinescu, C.S. *et al.*, 1998; Durie, F.H. *et al.*, 1994; Nagaraju, K. *et al.*, 2002; Swanborg, R.H., 1995) en comparant la pathologie induite chez des souris ART2 ou P2X₇ Ko à celle de leurs homologues normales.

7. Le rôle des ART sur d'autres cellules du système immunitaire

L'ADP-ribosylation des protéines membranaires par l'intermédiaire de l'ART2.2 conduit d'après nos résultats à la stimulation du récepteur P2X₇. A l'instar des lymphocytes T, d'autres cellules du système immunitaire expriment à la fois le récepteur P2X₇ et une ADP-ribosyl transférase. C'est le cas par exemple des macrophages humains qui expriment le récepteur P2X₇ et qui, après activation, expriment l'ART3 et l'ART4 (Grahnert, A. *et al.*, 2002; Gudipaty, L. *et al.*, 2001). C'est peut-être aussi le cas des neutrophiles qui chez l'Homme expriment l'ART1, dont l'activité est comparable à l'ART2.2, et qui expriment également le récepteur P2X₇ (Donnelly, L.E. *et al.*, 1996; Kefalas, P. *et al.*, 1998; Suh, B.C. *et al.*, 2001). L'expression de ce couple moléculaire laisse entrevoir la possibilité d'une activation du récepteur P2X₇ par la voie du NAD dans d'autres types cellulaires que les lymphocytes T et surtout, chez l'Homme. Des études devront être menées pour vérifier cette hypothèse. Dans le cas des neutrophiles humains, la stimulation du récepteur P2X₇ par l'ATP semble intervenir dans le processus d'activation et la génération de molécules oxydées (« burst » oxydatif) qui participe aux mécanismes de défense contre les pathogènes. Si le NAD pouvait également stimuler cette voie d'activation, sa libération par des cellules lésées par des pathogènes pourrait participer à l'amplification de la réponse inflammatoire et à la mise en place des mécanismes de défense.

Dans le cas des macrophages, la stimulation prolongée du récepteur P2X₇ par l'ATP conduit comme sur les lymphocytes T à la mort de ces cellules (Di Virgilio, F. *et al.*, 2001). Cependant, de nombreuses études montrent que cette voie présente un intérêt tout particulier dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires. En effet, la stimulation du récepteur P2X₇ par l'ATP conduit, parallèlement à la mort du macrophage, à celle des pathogènes intracellulaires qui perdent ainsi leur pouvoir infectieux. Ce phénomène est aujourd'hui bien documenté dans le modèle de l'infection des macrophages par différentes espèces de *Mycobacterium* sans que le mécanisme précis mis en jeu ne soit encore établi (Clemens, D.L. *et al.*, 1995; Fairbairn, I.P. *et al.*, 2001; Kusner, D.J. *et al.*, 2001; Lammas, D.A. *et al.*, 1997). Il serait intéressant de tester si le NAD est capable de stimuler le récepteur P2X₇ sur les

macrophages et de reproduire les effets de l'ATP. La voie du NAD offrirait un avantage par rapport à celle de l'ATP dont la concentration doit atteindre des valeurs supérieures au millimolaire pour stimuler le récepteur. De telles valeurs semblent peu compatibles avec les situations physiologiques car de nombreuses ATPases participent à une dégradation très rapide de l'ATP libéré dans le compartiment extracellulaire. Le NAD est actif à des concentrations bien plus faibles dont nous avons montré qu'elles sont compatibles avec les situations physiologiques. Si cette hypothèse se vérifiait, la voie du NAD offrirait à ces observations une pertinence physiologique qui manque pour le moment à la voie de l'ATP.

8. L'ADP-ribosylation des protéines membranaires peut-elle stimuler d'autres récepteurs de la famille P2X ?

Certains tissus expriment des ADP-ribosyltransférases mais n'expriment pas le récepteur P2X₇. C'est le cas, par exemple, des cellules de muscle squelettique ou des cardiomyocytes. Ces cellules expriment l'ART1 aussi bien chez l'Homme que chez la souris (Glowacki, G. *et al.*, 2002) ainsi que d'autres récepteurs P2X, comme les récepteurs P2X₃ et P2X₅ (North, R.A., 2002). La question se pose de savoir si, dans ces tissus, l'ADP-ribosylation des protéines membranaires est capable de stimuler ces autres récepteurs sensibles à l'ATP et à l'ADP appartenant à la même famille que P2X₇. Cette possibilité étendrait le mécanisme décrit ici à la surface des lymphocytes T murins à d'autres tissus et permettrait en particulier chez l'Homme de proposer des fonctions aux différentes ART (ART1, ART3, ART4 et ART5). D'un point de vue pharmacologique, cette perspective permettrait également de développer de nouvelles molécules analogues du NAD et substrats des ART susceptibles de moduler l'activité des récepteurs P2X. L'intérêt de telles molécules résiderait dans leur spécificité d'action puisqu'elles ne seraient actives que sur les cellules exprimant les ART et les récepteurs P2X. Comme dans le travail rapporté ici, leur efficacité offerte par leur

incorporation covalente à la surface membranaire à proximité immédiate des récepteurs P2X pourrait être accrue. Un brevet protégeant l'utilisation thérapeutique d'analogues du NAD susceptibles de se comporter comme des agonistes ou des antagonistes des récepteurs P2 a été déposé par notre laboratoire en collaboration avec l'équipe du Pr. Koch-Nolte aux noms de l'université Paris7 et de l'université de Hambourg (Adriouch, S., F. Haag, F. Koch-Nolte et M. Seman., 2002).

9. Les fonctions des ADP-ribosyl transférase chez l'Homme

Le mécanisme décrit dans ce mémoire dans le modèle murin et impliquant l'ART2.2 et le récepteur P2X₇, n'est pas directement transposable à l'Homme chez qui l'ART2 est un pseudogène non fonctionnel (Haag, F. *et al.*, 1994). Aussi, les lymphocytes T humains ne montrent aucune activité ADP-ribosyl transférase détectable à leur surface (résultats non publiés). Les lymphocytes T de l'Homme ne semblent donc pas pouvoir être soumis à une régulation par ces enzymes à moins que des ADP-ribosyl transférase présentes dans leur environnement immédiat puissent agir en *trans* sur leurs protéines membranaires. Les neutrophiles humains expriment par exemple l'ART1 dont l'activité est comparable à l'activité de l'ART2.2 murine (Donnelly, L.E. *et al.*, 1996; Kefalas, P. *et al.*, 1998). Il peut être envisagé que l'ART1 exprimée à la surface de ces neutrophiles puisse ADP-ribosyler les protéines membranaires des lymphocytes T lorsque ces deux types cellulaires se rencontrent dans le site inflammatoire. Alternativement, d'autres cellules de l'environnement inflammatoire sont susceptibles d'exprimer des ADP-ribosyl transférases. C'est le cas notamment des macrophages activés qui expriment l'ART3 et l'ART4 (Grahner, A. *et al.*, 2002). C'est aussi le cas des cellules épithéliales activées qui sont vraisemblablement dotées d'une activité ADP-ribosyl transférase. Il a en effet été montré très récemment que le peptide HNP-1 appartenant à la famille des défensines est ADP-ribosylé dans l'environnement

inflammatoire par les enzymes exprimées sur les cellules de l'épithélium respiratoire et/ou par les enzymes portées par les cellules inflammatoires (Paone, G. *et al.*, 2002). L'ADP-ribosylation de ce peptide régule son activité biologique en diminuant son effet cytotoxique tout en conservant son activité chimio-attractif. Ces observations confirment la possibilité d'ADP-ribosyler d'autres protéines que celles exprimées en *cis* sur la membrane à proximité immédiate de l'enzyme. L'ADP-ribosylation des protéines en *trans* étend considérablement le champ d'action de ces enzymes et permet d'envisager la régulation de l'activité des cellules environnantes et/ou des cytokines et chimiokines sécrétées par celles-ci. Dans cette étude, l'un des faits les plus intéressants est que le peptide HNP-1 est détecté sous sa forme ADP-ribosylé seulement dans les lavages broncho-alvéolaires des fumeurs. Ces résultats montrent donc que du NAD et des ADP-ribosyl transférases sont également présents *in vivo* dans les situations inflammatoires chez l'Homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbraccio, M. P., Brambilla, R., Ceruti, S., Kim, H. O., von Lubitz, D. K., Jacobson, K. A., et Cattabeni, F.** “G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain.” (1995). *Mol Pharmacol*, 48(6), 1038-45.
- Ablamunits, V., Bridgett, M., Duffy, T., Haag, F., Nissen, M., Koch-Nolte, F., et Leiter, H.** “Changing patterns of cell surface mono (ADP-ribosyl) transferase antigen ART2.2 on resting versus cytopathically-activated T cells in NOD/Lt mice.” (2001). *Diabetologia*, 44(7), 848-58.
- Abraham, E. H., Prat, A. G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R. J., Kramer, R., Guidotti, G., et Cantiello, H. F.** “The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel.” (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(1), 312-6.
- Adebanjo, O. A., Anandatheerthavarada, H. K., Koval, A. P., Moonga, B. S., Biswas, G., Sun, L., Sodam, B. R., Bevis, P. J., Huang, C. L., Epstein, S., Lai, F. A., Avadhani, N. G., et Zaidi, M.** “A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis.” (1999). *Nat Cell Biol*, 1(7), 409-14.
- Adebanjo, O. A., Koval, A., Moonga, B. S., Wu, X. B., Yao, S., Bevis, P. J., Kumegawa, M., Zaidi, M., et Sun, L.** “Molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel member of the CD38 family of ADP-ribosyl cyclases.” (2000). *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3), 884-9.
- Adriouch, S., F. Haag, F. Koch-Nolte et M. Seman.** “Utilisation de dérivés du NAD, substrats des mono-ADP-ribosyl transférases, comme régulateurs agonistes et antagonistes des récepteurs purinergiques P2.” (2002). (déposé en Juillet 2002 au nom de l'Université Paris7 et de l'université de Hambourg).
- Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F., et Haag, F.** “Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor.” (2002). *J Immunol*, 169(8), 4108-12.
- Adriouch, S., Ohlrogge, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., et Seman, M.** “Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector.” (2001). *J Immunol*, 167(1), 196-203.
- Airas, L.** “CD73 and adhesion of B-cells to follicular dendritic cells.” (1998). *Leuk Lymphoma*, 29(1-2), 37-47.
- Angelillo, M., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Nakamura, N., McKeever, U., et Rossini, A.** “Absence of RT6+ T cells in diabetes-prone biobreeding/Worcester rats is due to genetic and cell developmental defects.” (1988). *J Immunol*, 141(12), 4146-51.
- Apasov, S., Chen, J. F., Smith, P., et Sitkovsky, M.** “A(2A) receptor dependent and A(2A) receptor independent effects of extracellular adenosine on murine thymocytes in conditions of adenosine deaminase deficiency.” (2000). *Blood*, 95(12), 3859-67.
- Apasov, S. G., Blackburn, M. R., Kellems, R. E., Smith, P. T., et Sitkovsky, M. V.** “Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling.” (2001). *J Clin Invest*, 108(1), 131-41.
- Apasov, S. G., Smith, P. T., Jelonek, M. T., Margulies, D. H., et Sitkovsky, M. V.** “Phosphorylation of extracellular domains of T-lymphocyte surface proteins. Constitutive serine and threonine phosphorylation of the T cell antigen receptor ectodomains.” (1996). *J Biol Chem*, 271(41), 25677-83.

- Asako, H., Wolf, R. E., et Granger, D. N.** "Leukocyte adherence in rat mesenteric venules: effects of adenosine and methotrexate." (1993). *Gastroenterology*, 104(1), 31-7.
- Ausiello, C. M., la Sala, A., Ramoni, C., Urbani, F., Funaro, A., et Malavasi, F.** "Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation." (1996). *Cell Immunol*, 173(2), 192-7.
- Banerjee, R. K.** "Ecto-ATPase." (1981). *Mol Cell Biochem*, 37(2), 91-9.
- Banyer, J. L., Hamilton, N. H., Ramshaw, I. A., et Ramsay, A. J.** "Cytokines in innate and adaptive immunity." (2000). *Rev Immunogenet*, 2(3), 359-73.
- Bennett, J. S.** "Novel platelet inhibitors." (2001). *Annu Rev Med*, 52, 161-84.
- Bernofsky, C., et Swan, M.** "An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide." (1973). *Anal Biochem*, 53(2), 452-8.
- Berthelie, V., Tixier, J. M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., et Deterre, P.** "Human CD38 is an authentic NAD(P)⁺ glycohydrolase." (1998). *Biochem J*, 330(Pt 3), 1383-90.
- Bisaggio, R. D., Nihei, O. K., Persechini, P. M., Savino, W., et Alves, L. A.** "Characterization of P2 receptors in thymic epithelial cells." (2001). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 47(1), 19-31.
- Bollen, M., Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., et Stefan, C.** "Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move." (2000). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35(6), 393-432.
- Born, G. V., et Kratzer, M. A.** "Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man." (1984). *J Physiol*, 354, 419-29.
- Bouma, M. G., Jeunhomme, T. M., Boyle, D. L., Dentener, M. A., Voitenok, N. N., van den Wildenberg, F. A., et Buurman, W. A.** "Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors." (1997). *J Immunol*, 158(11), 5400-8.
- Braren, R., Glowacki, G., Nissen, M., Haag, F., et Koch-Nolte, F.** "Molecular characterization and expression of the gene for mouse NAD⁺:arginine ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase, Art1." (1998). *Biochem J*, 336(Pt 3), 561-8.
- Brough, D., Le Feuvre, R. A., Wheeler, R. D., Solovyova, N., Hilfiker, S., Rothwell, N. J., et Verkhratsky, A.** "Ca²⁺ Stores and Ca²⁺ Entry Differentially Contribute to the Release of IL-1beta and IL-1alpha from Murine Macrophages." (2003). *J Immunol*, 170(6), 3029-36.
- Bruzzone, S., Franco, L., Guida, L., Zocchi, E., Contini, P., Bisso, A., Usai, C., et De Flora, A.** "A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts." (2001). *J Biol Chem*, 276(51), 48300-8.
- Bunemann, M., et Pott, L.** "Down-regulation of A1 adenosine receptors coupled to muscarinic K⁺ current in cultured guinea-pig atrial myocytes." (1995). *J Physiol*, 482(Pt 1), 81-92.
- Burkle, A.** "Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation." (2001). *Bioessays*, 23(9), 795-806.
- Burnstock, G.** "Purinergetic nerves." (1972). *Pharmacol Rev*, 24(3), 509-81.
- Burnstock, G.** "Do some nerve cells release more than one transmitter?" (1976). *Neuroscience*, 1(4), 239-48.

- Burnstock, G.** "A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones." (1978). *Raven Press, New York (Bolis L and Straub RW eds)*, 80, 107-118.
- Burnstock, G.** "Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels." (1988). *Trends Pharmacol Sci*, 9(4), 116-7.
- Burnstock, G.** "Purine-mediated signalling in pain and visceral perception." (2001). *Trends Pharmacol Sci*, 22(4), 182-8.
- Burnstock, G., Campbell, G., Bennett, M., et Holman, M. E.** "Inervation of the guinea-pig taenia coli :are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves?" (1964). *Int J Neuropharmacol*, 3, 163-166.
- Burnstock, G., et Williams, M.** "P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential." (2000). *J Pharmacol Exp Ther*, 295(3), 862-9.
- Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H., Oppenheimer, N., et Schuber, F.** "Kinetic competence of the cADP-ribose-CD38 complex as an intermediate in the CD38/NAD⁺ glycohydrolase-catalysed reactions: implication for CD38 signalling." (2001). *Biochem J*, 358(Pt 2), 399-406.
- Cardenal, A., Masuda, I., Ono, W., Haas, A. L., Ryan, L. M., Trotter, D., et McCarty, D. J.** "Serum nucleotide pyrophosphohydrolase activity; elevated levels in osteoarthritis, calcium pyrophosphate crystal deposition disease, scleroderma, and fibromyalgia." (1998). *J Rheumatol*, 25(11), 2175-80.
- Cass, C. E., Young, J. D., et Baldwin, S. A.** "Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells." (1998). *Biochem Cell Biol*, 76(5), 761-70.
- Cena, V., et Rojas, E.** "Kinetic characteristics of calcium-dependent, cholinergic receptor controlled ATP secretion from adrenal medullary chromaffin cells." (1990). *Biochim Biophys Acta*, 1023(2), 213-22.
- Chakfe, Y., Seguin, R., Antel, J. P., Morissette, C., Malo, D., Henderson, D., et Seguela, P.** "ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels." (2002). *J Neurosci*, 22(8), 3061-9.
- Cheneval, D., Ramage, P., Kastelic, T., Szelestenyi, T., Niggli, H., Hemmig, R., Bachmann, M., et MacKenzie, A.** "Increased mature interleukin-1beta (IL-1beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1beta-converting enzyme processing." (1998). *J Biol Chem*, 273(28), 17846-51.
- Chessell, I. P., Simon, J., Hibell, A. D., Michel, A. D., Barnard, E. A., et Humphrey, P. P.** "Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor." (1998). *FEBS Lett*, 439(1-2), 26-30.
- Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., et Franco, R.** "Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors." (1996). *FEBS Lett*, 380(3), 219-23.
- Clemens, D. L., et Horwitz, M. A.** "Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited." (1995). *J Exp Med*, 181(1), 257-70.
- Clemens, M. G., et Forrester, T.** "Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia." (1981). *J Physiol*, 312, 143-58.

- Cockayne, D. A., Muchamuel, T., Grimaldi, J. C., Muller-Steffner, H., Randall, T. D., Lund, F. E., Murray, R., Schuber, F., et Howard, M. C.** “Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses.” (1998). *Blood*, 92(4), 1324-33.
- Cockcroft, S., et Gomperts, B. D.** “The ATP4- receptor of rat mast cells.” (1980). *Biochem J*, 188(3), 789-98.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., et Buell, G.** “Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels.” (1996). *J Neurosci*, 16(8), 2495-507.
- Constantinescu, C. S., Hilliard, B., Fujioka, T., Bhopale, M. K., Calida, D., et Rostami, A. M.** “Pathogenesis of neuroimmunologic diseases. Experimental models.” (1998). *Immunol Res*, 17(1-2), 217-27.
- Corda, D., et Di Girolamo, M.** “Mono-ADP-ribosylation: a tool for modulating immune response and cell signaling.” (2002). *Sci STKE*, 2002(163), E53.
- Coutinho-Silva, R., Perfettini, J. L., Persechini, P. M., Dautry-Varsat, A., et Ojcius, D. M.** “Modulation of P2Z/P2X(7) receptor activity in macrophages infected with *Chlamydia psittaci*.” (2001). *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(1), C81-9.
- Coutinho-Silva, R., Persechini, P. M., Bisaggio, R. D., Perfettini, J. L., Neto, A. C., Kanellopoulos, J. M., Motta-Ly, I., Dautry-Varsat, A., et Ojcius, D. M.** “P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells.” (1999). *Am J Physiol*, 276(5 Pt 1), C1139-47.
- Cronstein, B. N.** “A novel approach to the development of anti-inflammatory agents: adenosine release at inflamed sites.” (1995). *J Investig Med*, 43(1), 50-7.
- Cronstein, B. N., Kramer, S. B., Weissmann, G., et Hirschhorn, R.** “Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils.” (1983). *J Exp Med*, 158(4), 1160-77.
- Cronstein, B. N., Naime, D., et Ostad, E.** “The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation.” (1993). *J Clin Invest*, 92(6), 2675-82.
- Cronstein, B. N., Rosenstein, E. D., Kramer, S. B., Weissmann, G., et Hirschhorn, R.** “Adenosine; a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils.” (1985). *J Immunol*, 135(2), 1366-71.
- Cronstein, B. N., Van de Stouwe, M., Druska, L., Levin, R. I., et Weissmann, G.** “Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms.” (1994). *Inflammation*, 18(3), 323-35.
- Dart, C., et Standen, N. B.** “Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery.” (1993). *J Physiol*, 471, 767-86.
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., et Zocchi, E.** “The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox.” (1997). *Int J Biochem Cell Biol*, 29(10), 1149-66.
- Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K., et Malavasi, F.** “CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes.” (2000). *Chem Immunol*, 75, 99-120.

- Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., et Malavasi, F.** "Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member." (1998). *J Immunol*, 160(1), 395-402.
- DeLisser, H. M., Newman, P. J., et Albelda, S. M.** "Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31." (1994). *Immunol Today*, 15(10), 490-5.
- Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., Proctor, R. A., et Bertics, P. J.** "Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide." (2001). *J Immunol*, 167(4), 1871-6.
- Deterre, P., Berthelie, V., Bauvois, B., Dalloul, A., Schuber, F., et Lund, F.** "CD38 in T- and B-cell functions." (2000). *Chem Immunol*, 75, 146-68.
- Deterre, P., Gelman, L., Gary-Gouy, H., Arriemerlou, C., Berthelie, V., Tixier, J. M., Ktorza, S., Goding, J., Schmitt, C., et Bismuth, G.** "Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites." (1996). *J Immunol*, 157(4), 1381-8.
- Di Lisa, F., et Ziegler, M.** "Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD(+) metabolism." (2001). *FEBS Lett*, 492(1-2), 4-8.
- Di Virgilio, F.** "The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death." (1995). *Immunol Today*, 16(11), 524-8.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J. M., Venketaraman, V., et Baricordi, O. R.** "Cytolytic P2X purinoceptors." (1998). *Cell Death Differ*, 5(3), 191-9.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., et Baricordi, O. R.** "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." (2001). *Blood*, 97(3), 587-600.
- Di Virgilio, F., Pizzo, P., Zanovello, P., Bronte, V., et Collavo, D.** "Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity." (1990). *Immunol Today*, 11(8), 274-7.
- Dixon, A. K., Gubit, A. K., Sirinathsingji, D. J., Richardson, P. J., et Freeman, T. C.** "Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat." (1996). *Br J Pharmacol*, 118(6), 1461-8.
- Dombrowski, K. E., Ke, Y., Brewer, K. A., et Kapp, J. A.** "Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function." (1998). *Immunol Rev*, 161, 111-8.
- Domenighini, M., et Rappuoli, R.** "Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages." (1996). *Mol Microbiol*, 21(4), 667-74.
- Donnelly, L. E., Rendell, N. B., Murray, S., Allport, J. R., Lo, G., Kefalas, P., Taylor, G. W., et MacDermot, J.** "Arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes." (1996). *Biochem J*, 315(Pt 2), 635-41.
- Drury, A., et Szent-Györgyi, A.** "The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart." (1929). *J. Physiol.*, 68, 213-237.
- Durie, F. H., Fava, R. A., et Noelle, R. J.** "Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis." (1994). *Clin Immunol Immunopathol*, 73(1), 11-8.

- Dusenbery, K. E., Mendiola, J. R., et Skubitz, K. M.** “Evidence for ecto-protein kinase activity on the surface of human neutrophils.” (1988). *Biochem Biophys Res Commun*, 153(1), 7-13.
- Ehrlich, Y. H., Davis, T. B., Bock, E., Kornecki, E., et Lenox, R. H.** “Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells.” (1986). *Nature*, 320(6057), 67-70.
- Ehrlich, Y. H., et Kornecki, E.** “Extracellular protein phosphorylation systems in the regulation of cellular responsiveness.” (1987). *Prog Clin Biol Res*, 249, 193-204.
- Enyoji, K., Sevigny, J., Lin, Y., Frenette, P. S., Christie, P. D., Esch, J. S., 2nd, Imai, M., Edelberg, J. M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler, D. L., Csizmadia, E., Wagner, D. D., Robson, S. C., et Rosenberg, R. D.** “Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation.” (1999). *Nat Med*, 5(9), 1010-7.
- Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J. T., et Weisman, G. A.** “Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity.” (1995). *J Biol Chem*, 270(9), 4185-8.
- Ezeamuzie, C. I., et Philips, E.** “Adenosine A3 receptors on human eosinophils mediate inhibition of degranulation and superoxide anion release.” (1999). *Br J Pharmacol*, 127(1), 188-94.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., et Henson, P. M.** “A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.” (2000). *Nature*, 405(6782), 85-90.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., et Henson, P. M.** “Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.” (1992). *J Immunol*, 148(7), 2207-16.
- Fairbairn, I. P., Stober, C. B., Kumararatne, D. S., et Lammas, D. A.** “ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion.” (2001). *J Immunol*, 167(6), 3300-7.
- Felsch, A., Stocker, K., et Borchard, U.** “Phorbol ester-stimulated adherence of neutrophils to endothelial cells is reduced by adenosine A2 receptor agonists.” (1995). *J Immunol*, 155(1), 333-8.
- Feoktistov, I., et Biaggioni, I.** “Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma.” (1995). *J Clin Invest*, 96(4), 1979-86.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O. R., et Di Virgilio, F.** “Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages.” (1997a). *J Immunol*, 159(3), 1451-8.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M. K., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., et Schulze-Osthoff, K.** “P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death.” (1999). *FEBS Lett*, 447(1), 71-5.
- Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, M. K., et Schulze-Osthoff, K.** “Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65.” (1997b). *J Cell Biol*, 139(7), 1635-43.
- Ferre, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P., et Fuxe, K.** “Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia.” (1997). *Trends Neurosci*, 20(10), 482-7.
- Ferrero, E., Saccucci, F., et Malavasi, F.** “The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene.” (1999). *Immunogenetics*, 49(7-8), 597-604.

- Filippini, A., Taffs, R. E., et Sitkovsky, M. V.** “Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions.” (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21), 8267-71.
- Forrester, T.** “A quantitative estimation of adenosine triphosphate released from human forearm muscle during sustained exercise.” (1972). *J Physiol*, 221(1), 25P-26P.
- Forrester, T., et Lind, A. R.** “Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions.” (1969). *J Physiol*, 204(2), 347-64.
- Fowell, D., et Mason, D.** “Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential.” (1993). *J Exp Med*, 177(3), 627-36.
- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., Usai, C., et De Flora, A.** “The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes.” (1998). *Faseb J*, 12(14), 1507-20.
- Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., et Blanco, J.** “Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes.” (1998). *Immunol Rev*, 161, 27-42.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P., et Williams, M.** “Nomenclature and classification of purinoceptors.” (1994). *Pharmacol Rev*, 46(2), 143-56.
- Fredholm, B. B., Burnstock, G., Harden, K. T., et Spedding, M.** “Receptor nomenclature.” (1996). *Drug Dev Res*, 39, 461-466.
- Freedman, B. D., Liu, Q. H., Gaulton, G., Kotlikoff, M. I., Hescheler, J., et Fleischmann, B. K.** “ATP-evoked Ca²⁺ transients and currents in murine thymocytes: possible role for P2X receptors in death by neglect.” (1999). *Eur J Immunol*, 29(5), 1635-46.
- Freissmuth, M., Schutz, W., et Linder, M. E.** “Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3.” (1991). *J Biol Chem*, 266(27), 17778-83.
- Funaro, A., Spagnoli, G. C., Ausiello, C. M., Alessio, M., Roggero, S., Delia, D., Zaccolo, M., et Malavasi, F.** “Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation.” (1990). *J Immunol*, 145(8), 2390-6.
- Gachet, C.** “ADP receptors of platelets and their inhibition.” (2001). *Thromb Haemost*, 86(1), 222-32.
- Geberhiwot, T., et Skoglund, G.** “Cell surface and serum protein phosphorylation by U-937 cell ectoprotein kinases.” (1997). *Biochem Mol Biol Int*, 41(2), 269-78.
- Gendron, F. P., Neary, J. T., Theiss, P. M., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A., et Weisman, G. A.** “Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells.” (2003). *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(2), C571-81.
- Gillespie, J. H.** “The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid.” (1934). *J Physiol (Lond)*, 80, 345-349.
- Glowacki, G., Braren, R., Firner, K., Nissen, M., Kuhl, M., Reche, P., Bazan, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E., Haag, F., et Koch-Nolte, F.** “The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse.” (2002). *Protein Sci*, 11(7), 1657-70.

- Goding, J. W.** "Ecto-enzymes: physiology meets pathology." (2000). *J Leukoc Biol*, 67(3), 285-311.
- Goding, J. W., et Howard, M. C.** "Ecto-enzymes of lymphoid cells." (1998a). *Immunol Rev*, 161, 5-10.
- Goding, J. W., Terkeltaub, R., Maurice, M., Deterre, P., Sali, A., et Belli, S. I.** "Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family." (1998b). *Immunol Rev*, 161, 11-26.
- Gordon, E. L., Pearson, J. D., et Slakey, L. L.** "The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface." (1986). *J Biol Chem*, 261(33), 15496-507.
- Gordon, J. L.** "Extracellular ATP: effects, sources and fate." (1986). *Biochem J*, 233(2), 309-19.
- Grahner, A., Friedrich, M., Pfister, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., et Hauschildt, S.** "Mono-ADP-ribosyltransferases in human monocytes: regulation by lipopolysaccharide." (2002). *Biochem J*, 362(Pt 3), 717-23.
- Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Angelillo, M., Nakamura, N., et Rossini, A. A.** "Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats." (1987). *J Exp Med*, 166(2), 461-75.
- Gu, B. J., Zhang, W., Worthington, R. A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., Barden, J. A., et Wiley, J. S.** "A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor." (2001). *J Biol Chem*, 276(14), 11135-42.
- Gudipaty, L., Humphreys, B. D., Buell, G., et Dubyak, G. R.** "Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density." (2001). *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(4), C943-53.
- Guida, L., Bruzzone, S., Sturla, L., Franco, L., Zocchi, E., et De Flora, A.** "Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts." (2002). *J Biol Chem*, 277(49), 47097-105.
- Guse, A. H.** "Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca²⁺-signaling and cell function." (2002). *Curr Mol Med*, 2(3), 273-82.
- Haag, F., Freese, D., Scheuplein, F., Ohlrogge, W., Adriouch, S., Seman, M., et Koch-Nolte, F.** "T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD." (2003 sous presse). *Developmental Immunology*.
- Haag, F., et Koch-Nolte, F.** "The vertebrate gene family of mono(ADP-ribosyl)transferases. Proposal for a unified nomenclature." (1997). *Adv Exp Med Biol*, 419, 459-62.
- Haag, F., et Koch-Nolte, F.** "Endogenous relatives of ADP-ribosylating bacterial toxins in mice and men: potential regulators of immune cell function." (1998). *J Biol Regul Homeost Agents*, 12(3), 53-62.
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Kuhl, M., Lorenzen, S., et Thiele, H. G.** "Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species." (1994). *J Mol Biol*, 243(3), 537-46.
- Haag, F., Nolte, F., Lernmark, A., Simrell, C., et Thiele, H. G.** "Analysis of T-cell surface marker profiles during the postnatal ontogeny of normal and diabetes-prone rats." (1993). *Transplant Proc*, 25(5), 2831-2.

- Hammill, A. K., Uhr, J. W., et Scheuermann, R. H.** “Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death.” (1999). *Exp Cell Res*, 251(1), 16-21.
- Hara, N., Badruzzaman, M., Sugae, T., Shimoyama, M., et Tsuchiya, M.** “Mouse Rt6.1 is a thiol-dependent arginine-specific ADP-ribosyltransferase.” (1999). *Eur J Biochem*, 259(1-2), 289-94.
- Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J. P., et Gachet, C.** “The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation.” (1998). *Blood*, 92(1), 152-9.
- Henney, C. S.** “Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. II. The use of various target cell markers to study cytolytic events.” (1973). *J Immunol*, 110(1), 73-84.
- Herceg, Z., et Wang, Z. Q.** “Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death.” (2001). *Mutat Res*, 477(1-2), 97-110.
- Herrera, C., Casado, V., Ciruela, F., Schofield, P., Mallol, J., Lluís, C., et Franco, R.** “Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells.” (2001). *Mol Pharmacol*, 59(1), 127-34.
- Hibell, A. D., Kidd, E. J., Chessell, I. P., Humphrey, P. P., et Michel, A. D.** “Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors.” (2000). *Br J Pharmacol*, 130(1), 167-73.
- Hibell, A. D., Thompson, K. M., Simon, J., Xing, M., Humphrey, P. P., et Michel, A. D.** “Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors.” (2001). *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 363(6), 639-48.
- Hicks-Berger, C. A., Chadwick, B. P., Frischauf, A. M., et Kirley, T. L.** “Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2).” (2000). *J Biol Chem*, 275(44), 34041-5.
- Horenstein, A. L., Stockinger, H., Imhof, B. A., et Malavasi, F.** “CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31.” (1998). *Biochem J*, 330(Pt 3), 1129-35.
- Hourani, S. M., et Hall, D. A.** “P2T purinoceptors: ADP receptors on platelets.” (1996). *Ciba Found Symp*, 198, 53-64; discussion 64-70.
- Hoyle, C. H.** “Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function.” (1990). *Gen Pharmacol*, 21(6), 827-31.
- Hsueh, R. C., et Scheuermann, R. H.** “Tyrosine kinase activation in the decision between growth, differentiation, and death responses initiated from the B cell antigen receptor.” (2000). *Adv Immunol*, 75, 283-316.
- Humphreys, B. D., et Dubyak, G. R.** “Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line.” (1996). *J Immunol*, 157(12), 5627-37.
- Humphreys, B. D., Rice, J., Kertesy, S. B., et Dubyak, G. R.** “Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor.” (2000). *J Biol Chem*, 275(35), 26792-8.
- Idzko, M., Dichmann, S., Ferrari, D., Di Virgilio, F., la Sala, A., Girolomoni, G., Panther, E., et Norgauer, J.** “Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors.” (2002). *Blood*, 100(3), 925-32.

- Ikeuchi, Y., Nishizaki, T., Mori, M., et Okada, Y.** “Adenosine activates the K⁺ channel and enhances cytosolic Ca²⁺ release via a P2Y purinoceptor in hippocampal neurons.” (1996). *Eur J Pharmacol*, 304(1-3), 191-9.
- Iredale, P. A., Alexander, S. P., et Hill, S. J.** “Coupling of a transfected human brain A1 adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilisation via a pertussis toxin-sensitive mechanism.” (1994). *Br J Pharmacol*, 111(4), 1252-6.
- Isakov, N., Wange, R. L., et Samelson, L. E.** “The role of tyrosine kinases and phosphotyrosine-containing recognition motifs in regulation of the T cell-antigen receptor-mediated signal transduction pathway.” (1994). *J Leukoc Biol*, 55(2), 265-71.
- Ito, H., Hosoya, Y., Inanobe, A., Tomoike, H., et Endoh, M.** “Acetylcholine and adenosine activate the G protein-gated muscarinic K⁺ channel in ferret ventricular myocytes.” (1995). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 351(6), 610-7.
- Ito, H., Vereecke, J., et Carmeliet, E.** “Mode of regulation by G protein of the ATP-sensitive K⁺ channel in guinea-pig ventricular cell membrane.” (1994). *J Physiol*, 478(Pt 1), 101-7.
- Jacobson, E. L., et Jacobson, M. K.** “Pyridine nucleotide levels as a function of growth in normal and transformed 3T3 cells.” (1976). *Arch Biochem Biophys*, 175(2), 627-34.
- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F., et Williams, M.** “Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets.” (2002). *J Med Chem*, 45(19), 4057-93.
- Jiang, Q., Guo, D., Lee, B. X., Van Rhee, A. M., Kim, Y. C., Nicholas, R. A., Schachter, J. B., Harden, T. K., et Jacobson, K. A.** “A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y1 receptor.” (1997). *Mol Pharmacol*, 52(3), 499-507.
- Jin, J., Daniel, J. L., et Kunapuli, S. P.** “Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets.” (1998). *J Biol Chem*, 273(4), 2030-4.
- Ju, S. T., Matsui, K., et Ozdemirli, M.** “Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction.” (1999). *Int Rev Immunol*, 18(5-6), 485-513.
- Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E. H., Haag, F., et Koch-Nolte, F.** “Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation.” (2000). *J Immunol*, 165(8), 4463-9.
- Kanaitsuka, T., Bortell, R., Stevens, L. A., Moss, J., Sardinha, D., Rajan, T. V., Zipris, D., Mordes, J. P., Greiner, D. L., et Rossini, A. A.** “Expression in BALB/c and C57BL/6 mice of Rt6-1 and Rt6-2 ADP-ribosyltransferases that differ in enzymatic activity: C57BL/6 Rt6-1 is a natural transferase knockout.” (1997). *J Immunol*, 159(6), 2741-9.
- Kannan, S.** “E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation.” (2002). *Med Hypotheses*, 58(6), 527-8.
- Kefalas, P., Yadollahi-Farsani, M., Saxty, B. A., et MacDermot, J.** “Arginine-specific ADP-ribosyltransferase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes: cDNA cloning and identification of a polymorphic site in the coding region.” (1998). *Biochem Soc Trans*, 26(1), S81.
- Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C., et Lester, H. A.** “Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds.” (1999). *Nat Neurosci*, 2(4), 322-30.

- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M., et Humphrey, P. P.** “International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits.” (2001). *Pharmacol Rev*, 53(1), 107-18.
- Kichenin, K., Pignede, G., Fudalej, F., et Seman, M.** “CD3 activation induces concentrative nucleoside transport in human T lymphocytes.” (2000). *Eur J Immunol*, 30(2), 366-70.
- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A., et Surprenant, A.** “Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex.” (2001). *Embo J*, 20(22), 6347-58.
- Kim, U. H., Kim, M. K., Kim, J. S., Han, M. K., Park, B. H., et Kim, H. R.** “Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes.” (1993). *Arch Biochem Biophys*, 305(1), 147-52.
- Kishimoto, H., et Sprent, J.** “The thymus and central tolerance.” (2000). *Clin Immunol*, 95(1 Pt 2), S3-7.
- Klapperstuck, M., Buttner, C., Schmalzing, G., et Markwardt, F.** “Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor.” (2001). *J Physiol*, 534(Pt 1), 25-35.
- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Killeen, N., Ablamunits, V., Haag, F., et Leiter, E. H.** “A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation.” (1999). *J Immunol*, 163(11), 6014-22.
- Koch-Nolte, F., et Haag, F.** “Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families.” (1997a). *Adv Exp Med Biol*, 419, 1-13.
- Koch-Nolte, F., Haag, F., Braren, R., Kuhl, M., Hoovers, J., Balasubramanian, S., Bazan, F., et Thiele, H. G.** “Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins.” (1997b). *Genomics*, 39(3), 370-6.
- Koch-Nolte, F., Haag, F., Kastelein, R., et Bazan, F.** “Uncovered: the family relationship of a T-cell-membrane protein and bacterial toxins.” (1996a). *Immunol Today*, 17(9), 402-5.
- Koch-Nolte, F., Klein, J., Hollmann, C., Kuhl, M., Haag, F., Gaskins, H. R., Leiter, E., et Thiele, H. G.** “Defects in the structure and expression of the genes for the T cell marker Rt6 in NZW and (NZB x NZW)F1 mice.” (1995). *Int Immunol*, 7(5), 883-90.
- Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., et Thiele, H. G.** “Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins.” (1996b). *J Biol Chem*, 271(13), 7686-93.
- Koch-Nolte, F., Reche, P., Haag, F., et Bazan, F.** “ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets.” (2001). *J Biotechnol*, 92(2), 81-7.
- Kohno, Y., Sei, Y., Koshiba, M., Kim, H. O., et Jacobson, K. A.** “Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A(3) receptor agonists.” (1996). *Biochem Biophys Res Commun*, 219(3), 904-10.
- Krammer, P. H.** “CD95's deadly mission in the immune system.” (2000). *Nature*, 407(6805), 789-95.

- Krebs, C., Koestner, W., Nissen, M., Welge, V., Parusel, I., Malavasi, F., Leiter, E. H., Santella, R. M., Haag, F., et Koch-Nolte, F.** “Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine.” (2003). *Anal Biochem*, 314(1), 108-115.
- Krueger, K. M., et Barbieri, J. T.** “The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins.” (1995). *Clin Microbiol Rev*, 8(1), 34-47.
- Kusner, D. J., et Barton, J. A.** “ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion.” (2001). *J Immunol*, 167(6), 3308-15.
- la Sala, A., Sebastiani, S., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., et Girolomoni, G.** “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.” (2002). *Blood*, 99(5), 1715-22.
- Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., Brissette, W., Wicks, J. R., Audoly, L., et Gabel, C. A.** “Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response.” (2002). *J Immunol*, 168(12), 6436-45.
- Lages, B., et Weiss, H. J.** “Secreted dense granule adenine nucleotides promote calcium influx and the maintenance of elevated cytosolic calcium levels in stimulated human platelets.” (1999). *Thromb Haemost*, 81(2), 286-92.
- Lahiri, S. S.** “Bacterial toxins--an overview.” (2000). *J Nat Toxins*, 9(4), 381-408.
- Lammas, D. A., Stober, C., Harvey, C. J., Kendrick, N., Panchalingam, S., et Kumararatne, D. S.** “ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors.” (1997). *Immunity*, 7(3), 433-44.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G., et Parmentier, M.** “Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor.” (1997). *Nature*, 388(6643), 674-8.
- Lemasters, J. J., Qian, T., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Cascio, W. E., Trost, L. C., Nishimura, Y., Nieminen, A. L., et Herman, B.** “Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death.” (1999). *J Bioenerg Biomembr*, 31(4), 305-19.
- Li, C. M., Campbell, S. J., Kumararatne, D. S., Bellamy, R., Ruwende, C., McAdam, K. P., Hill, A. V., et Lammas, D. A.** “Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population.” (2002). *J Infect Dis*, 186(10), 1458-62.
- Liu, Z., Cumberland, W. G., Hultin, L. E., Prince, H. E., Detels, R., et Giorgi, J. V.** “Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression.” (1997). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 16(2), 83-92.
- Liu, Z. X., Azhipa, O., Okamoto, S., Govindarajan, S., et Dennert, G.** “Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces t cell apoptosis in vivo and in vitro.” (2001). *J Immunol*, 167(9), 4942-7.
- Liu, Z. X., Yu, Y., et Dennert, G.** “A cell surface ADP-ribosyltransferase modulates T cell receptor association and signaling.” (1999). *J Biol Chem*, 274(25), 17399-401.

- Lluis, C., Franco, R., et Cordero, O.** “Ecto-ADA in the development of the immune system.” (1998). *Immunol Today*, 19(11), 533-4.
- Londos, C., Cooper, D. M., et Wolff, J.** “Subclasses of external adenosine receptors.” (1980). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(5), 2551-4.
- Lund, F., Solvason, N., Grimaldi, J. C., Parkhouse, R. M., et Howard, M.** “Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme.” (1995). *Immunol Today*, 16(10), 469-73.
- Lund, F. E., Cockayne, D. A., Randall, T. D., Solvason, N., Schuber, F., et Howard, M. C.** “CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction.” (1998). *Immunol Rev*, 161, 79-93.
- Lund, F. E., Muller-Steffner, H. M., Yu, N., Stout, C. D., Schuber, F., et Howard, M. C.** “CD38 signaling in B lymphocytes is controlled by its ectodomain but occurs independently of enzymatically generated ADP-ribose or cyclic ADP-ribose.” (1999). *J Immunol*, 162(5), 2693-702.
- Lund, F. E., Yu, N., Kim, K. M., Reth, M., et Howard, M. C.** “Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression.” (1996). *J Immunol*, 157(4), 1455-67.
- Lupi, R., Corda, D., et Di Girolamo, M.** “Endogenous ADP-ribosylation of the G protein beta subunit prevents the inhibition of type 1 adenylyl cyclase.” (2000). *J Biol Chem*, 275(13), 9418-24.
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., et Surprenant, A.** “Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding.” (2001). *Immunity*, 15(5), 825-35.
- Maliszewski, C. R., Delespesse, G. J., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Poindexter, K., Birks, C., et al.** “The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization.” (1994). *J Immunol*, 153(8), 3574-83.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., 3rd, Freedman, V. H., et Kaplan, G.** “Mycobacterium tuberculosis catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro.” (1999). *Infect Immun*, 67(1), 74-9.
- Mancino, G., Placido, R., et Di Virgilio, F.** “P2X7 receptors and apoptosis in tuberculosis infection.” (2001). *J Biol Regul Homeost Agents*, 15(3), 286-93.
- Martin, M., Centelles, J. J., Huguet, J., Echevarne, F., Colomer, D., Vives-Corrons, J. L., et Franco, R.** “Surface expression of adenosine deaminase in mitogen-stimulated lymphocytes.” (1993). *Clin Exp Immunol*, 93(2), 286-91.
- Megson, A. C., Dickenson, J. M., Townsend-Nicholson, A., et Hill, S. J.** “Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells.” (1995). *Br J Pharmacol*, 115(8), 1415-24.
- Mitchell, C. H., Carre, D. A., McGlenn, A. M., Stone, R. A., et Civan, M. M.** “A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells.” (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 7174-8.
- Mizumoto, N., Kumamoto, T., Robson, S. C., Sevigny, J., Matsue, H., Enjyoji, K., et Takashima, A.** “CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness.” (2002). *Nat Med*, 8(4), 358-65.
- Montesinos, M. C., Desai, A., Chen, J. F., Yee, H., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., et Cronstein, B. N.** “Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors.” (2002). *Am J Pathol*, 160(6), 2009-18.

- Morabito, L., Montesinos, M. C., Schreiber, D. M., Balter, L., Thompson, L. F., Resta, R., Carlin, G., Huie, M. A., et Cronstein, B. N.** “Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides.” (1998). *J Clin Invest*, 101(2), 295-300.
- Morra, M., Zubiaur, M., Terhorst, C., Sancho, J., et Malavasi, F.** “CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells.” (1998). *Faseb J*, 12(7), 581-92.
- Mueller-Dieckmann, C., Ritter, H., Haag, F., Koch-Nolte, F., et Schulz, G. E.** “Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat.” (2002). *J Mol Biol*, 322(4), 687-96.
- Mulero, J. J., Yeung, G., Nelken, S. T., et Ford, J. E.** “CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates.” (1999). *J Biol Chem*, 274(29), 20064-7.
- Munshi, R., Pang, I. H., Sternweis, P. C., et Linden, J.** “A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go.” (1991). *J Biol Chem*, 266(33), 22285-9.
- Nagaraju, K., et Plotz, P. H.** “Animal models of myositis.” (2002). *Rheum Dis Clin North Am*, 28(4), 917-33.
- Nemoto, E., Stohlman, S., et Dennert, G.** “Release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase from cytotoxic T cells upon activation.” (1996a). *J Immunol*, 156(1), 85-92.
- Nemoto, E., Yu, Y., et Dennert, G.** “Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells.” (1996b). *J Immunol*, 157(8), 3341-9.
- Newman, P. J.** “The biology of PECAM-1.” (1997). *J Clin Invest*, 99(1), 3-8.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., et Schmalzing, G.** “P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels.” (1998). *Embo J*, 17(11), 3016-28.
- Nieber, K., Poelchen, W., et Illes, P.** “Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat.” (1997). *Br J Pharmacol*, 122(3), 423-30.
- North, R. A.** “Molecular physiology of P2X receptors.” (2002). *Physiol Rev*, 82(4), 1013-67.
- North, R. A., et Surprenant, A.** “Pharmacology of cloned P2X receptors.” (2000). *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 563-80.
- Ohlrogge, W., Haag, F., Lohler, J., Seman, M., Littman, D. R., Killeen, N., et Koch-Nolte, F.** “Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice.” (2002). *Mol Cell Biol*, 22(21), 7535-42.
- Ohta, A., et Sitkovsky, M.** “Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage.” (2001). *Nature*, 414(6866), 916-20.
- Okamoto, S., Azhipa, O., Yu, Y., Russo, E., et Dennert, G.** “Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function.” (1998). *J Immunol*, 160(9), 4190-8.
- Okazaki, I. J., Kim, H. J., McElvaney, N. G., Lesma, E., et Moss, J.** “Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferase from lymphocytes.” (1996a). *Blood*, 88(3), 915-21.

- Okazaki, I. J., Kim, H. J., et Moss, J.** “Cloning and characterization of a novel membrane-associated lymphocyte NAD:arginine ADP-ribosyltransferase.” (1996b). *J Biol Chem*, 271(36), 22052-7.
- Okazaki, I. J., et Moss, J.** “Structure and function of eukaryotic mono-ADP-ribosyltransferases.” (1996c). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 129, 51-104.
- Okazaki, I. J., et Moss, J.** “Glycosylphosphatidylinositol-anchored and secretory isoforms of mono-ADP-ribosyltransferases.” (1998). *J Biol Chem*, 273(37), 23617-20.
- Okazaki, I. J., et Moss, J.** “Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases.” (1999). *Annu Rev Nutr*, 19, 485-509.
- Olah, M. E., Jacobson, K. A., et Stiles, G. L.** “Role of the second extracellular loop of adenosine receptors in agonist and antagonist binding. Analysis of chimeric A1/A3 adenosine receptors.” (1994). *J Biol Chem*, 269(40), 24692-8.
- Olah, M. E., Ren, H., et Stiles, G. L.** “Adenosine receptors: protein and gene structure.” (1995a). *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 329(1), 135-50.
- Olah, M. E., et Stiles, G. L.** “Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation.” (1995b). *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 581-606.
- Olah, M. E., et Stiles, G. L.** “The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity.” (2000). *Pharmacol Ther*, 85(2), 55-75.
- Ortolan, E., Vacca, P., Capobianco, A., Armando, E., Crivellin, F., Horenstein, A., et Malavasi, F.** “CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality.” (2002). *Cell Biochem Funct*, 20(4), 309-22.
- Oxhorn, B. C., Cheek, D. J., et Buxton, I. L.** “Role of nucleotides and nucleosides in the regulation of cardiac blood flow.” (2000). *AACN Clin Issues*, 11(2), 241-51.
- Pallen, M. J., Lam, A. C., Loman, N. J., et McBride, A.** “An abundance of bacterial ADP-ribosyltransferases-implications for the origin of exotoxins and their human homologues.” (2001). *Trends Microbiol*, 9(7), 302-7; discussion 308.
- Palmer, T. M., Benovic, J. L., et Stiles, G. L.** “Molecular basis for subtype-specific desensitization of inhibitory adenosine receptors. Analysis of a chimeric A1-A3 adenosine receptor.” (1996). *J Biol Chem*, 271(25), 15272-8.
- Pankiewicz, K. W.** “Novel nicotinamide adenine dinucleotide analogues as potential anticancer agents: quest for specific inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase.” (1997). *Pharmacol Ther*, 76(1-3), 89-100.
- Paone, G., Wada, A., Stevens, L. A., Matin, A., Hirayama, T., Levine, R. L., et Moss, J.** “ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties.” (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12), 8231-5.
- Parmely, M. J., Zhou, W. W., Edwards, C. K., 3rd, Borcharding, D. R., Silverstein, R., et Morrison, D. C.** “Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue selectively inhibit tumor necrosis factor- α production and protect mice against endotoxin challenge.” (1993). *J Immunol*, 151(1), 389-96.
- Partida-Sanchez, S., Cockayne, D. A., Monard, S., Jacobson, E. L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T. D., et Lund, F. E.** “Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo.” (2001). *Nat Med*, 7(11), 1209-16.

- Patel, V., Brown, C., Goodwin, A., Wilkie, N., et Boarder, M. R.** "Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production." (1996). *Biochem J*, 320(Pt 1), 221-6.
- Peakman, M. C., et Hill, S. J.** "Adenosine A1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes." (1995). *Br J Pharmacol*, 115(5), 801-10.
- Piersen, C. E., True, C. D., et Wells, J. N.** "A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A2a adenosine receptors retain ligand binding." (1994). *Mol Pharmacol*, 45(5), 861-70.
- Pintor, J., Gualix, J., et Miras-Portugal, M. T.** "Diinosine Polyphosphates, a Group of Dinucleotides with Antagonistic Effects on Diadenosine Polyphosphate Receptor." (1997). *Mol Pharmacol*, 51(2), 277-284.
- Pintor, J., et Miras-Portugal, M.** "A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes." (1995). *Br. J. Pharmacol.*, 115(6), 895-902.
- Popoff, M. R.** "Interactions between bacterial toxins and intestinal cells." (1998). *Toxicon*, 36(4), 665-85.
- Prochazka, M., Gaskins, H. R., Leiter, E. H., Koch-Nolte, F., Haag, F., et Thiele, H. G.** "Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6." (1991). *Immunogenetics*, 33(2), 152-6.
- Ralevic, V., et Burnstock, G.** "Receptors for Purines and Pyrimidines." (1998). *Pharmacol Rev*, 50(3), 413-492.
- Ramkumar, V., Stiles, G. L., Beaven, M. A., et Ali, H.** "The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells." (1993). *J Biol Chem*, 268(23), 16887-90.
- Rassendren, F., Buell, G. N., Virginio, C., Collo, G., North, R. A., et Surprenant, A.** "The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA." (1997). *J Biol Chem*, 272(9), 5482-6.
- Redegeld, F. A., Caldwell, C. C., et Sitkovsky, M. V.** "Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?" (1999). *Trends Pharmacol Sci*, 20(11), 453-9.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Stehle, J. H., et Rivkees, S. A.** "Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord." (1991). *Mol Endocrinol*, 5(8), 1037-48.
- Resta, R., Yamashita, Y., et Thompson, L. F.** "Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73." (1998). *Immunol Rev*, 161, 95-109.
- Revan, S., Montesinos, M. C., Naime, D., Landau, S., et Cronstein, B. N.** "Adenosine A2 receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase." (1996). *J Biol Chem*, 271(29), 17114-8.
- Ross, P. E., Ehring, G. R., et Cahalan, M. D.** "Dynamics of ATP-induced calcium signaling in single mouse thymocytes." (1997). *J Cell Biol*, 138(5), 987-98.
- Rubino, A., Ralevic, V., et Burnstock, G.** "Contribution of P1-(A2b subtype) and P2-purinoceptors to the control of vascular tone in the rat isolated mesenteric arterial bed." (1995). *Br J Pharmacol*, 115(4), 648-52.

- Ryan, L. M., Rachow, J. W., McCarty, B. A., et McCarty, D. J.** “Adenosine triphosphate levels in human plasma.” (1996). *J Rheumatol*, 23(2), 214-9.
- Sage, S. O., Reast, R., et Rink, T. J.** “ADP evokes biphasic Ca²⁺ influx in fura-2-loaded human platelets. Evidence for Ca²⁺ entry regulated by the intracellular Ca²⁺ store.” (1990). *Biochem J*, 265(3), 675-80.
- Sajjadi, F. G., Takabayashi, K., Foster, A. C., Domingo, R. C., et Firestein, G. S.** “Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors.” (1996). *J Immunol*, 156(9), 3435-42.
- Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R., et Guggino, W. B.** “CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP.” (1995). *Cell*, 81(7), 1063-73.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., et Ohashi, P. S.** “Selection of the T cell repertoire.” (1999). *Annu Rev Immunol*, 17, 829-74.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Freese, D., Krebs, C., Haag, F., et Koch-Nolte, F.** “NAD-induced T cell death: cell surface ADP-ribosylation by ART2.2 activates the cytolytic P2X7 receptor.” (soumis en 2003 à Immunity)..
- Sikora, A., Liu, J., Brosnan, C., Buell, G., Chessel, I., et Bloom, B. R.** “Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism.” (1999). *J Immunol*, 163(2), 558-61.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J., et Gabel, C. A.** “Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors.” (2001). *J Biol Chem*, 276(1), 125-32.
- Stiffel, C., Ibanez, O. M., Ribeiro, O. G., Decreusefond, C., Mouton, D., Siqueira, M., et Biozzi, G.** “Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses.” (1990). *Exp Clin Immunogenet*, 7(4), 221-33.
- Strickler, J., Jacobson, K. A., et Liang, B. T.** “Direct preconditioning of cultured chick ventricular myocytes. Novel functions of cardiac adenosine A2a and A3 receptors.” (1996). *J Clin Invest*, 98(8), 1773-9.
- Suh, B. C., Kim, J. S., Namgung, U., Ha, H., et Kim, K. T.** “P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils.” (2001). *J Immunol*, 166(11), 6754-63.
- Sun, L., Adebajo, O. A., Koval, A., Anandatheerthavarada, H. K., Iqbal, J., Wu, X. Y., Moonga, B. S., Wu, X. B., Biswas, G., Bevis, P. J., Kumegawa, M., Epstein, S., Huang, C. L., Avadhani, N. G., Abe, E., et Zaidi, M.** “A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca²⁺ signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD⁺ sensor.” (2002). *Faseb J*, 16(3), 302-14.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., et Buell, G.** “The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7).” (1996). *Science*, 272(5262), 735-8.
- Swanborg, R. H.** “Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease.” (1995). *Clin Immunol Immunopathol*, 77(1), 4-13.
- Taylor, A. L., Kudlow, B. A., Marrs, K. L., Gruenert, D. C., Guggino, W. B., et Schwiebert, E. M.** “Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia.” (1998). *Am J Physiol*, 275(5 Pt 1), C1391-406.

- Theofilopoulos, A. N., et Kofler, R.** “Molecular aspects of autoimmunity.” (1989). *Immunol Today*, 10(6), 180-3.
- Thompson, L. F., Van de Wiele, C. J., Laurent, A. B., Hooker, S. W., Vaughn, J. G., Jiang, H., Khare, K., Kellems, R. E., Blackburn, M. R., Hershfield, M. S., et Resta, R.** “Metabolites from apoptotic thymocytes inhibit thymopoiesis in adenosine deaminase-deficient fetal thymic organ cultures.” (2000). *J Clin Invest*, 106(9), 1149-57.
- Tucker, A. L., et Linden, J.** “Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine.” (1993). *Cardiovasc Res*, 27(1), 62-7.
- Van Calker, D., Muller, M., et Hamprecht, B.** “Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells.” (1978). *Nature*, 276(5690), 839-41.
- Van De Wiele, C. J., Vaughn, J. G., Blackburn, M. R., Ledent, C. A., Jacobson, M., Jiang, H., et Thompson, L. F.** “Adenosine kinase inhibition promotes survival of fetal adenosine deaminase-deficient thymocytes by blocking dATP accumulation.” (2002). *J Clin Invest*, 110(3), 395-402.
- Van Driel, I. R., Wilks, A. F., Pietersz, G. A., et Goding, J. W.** “Murine plasma cell membrane antigen PC-1: molecular cloning of cDNA and analysis of expression.” (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(24), 8619-23.
- Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F. A., North, R. A., et Surprenant, A.** “Pore dilation of neuronal P2X receptor channels.” (1999). *Nat Neurosci*, 2(4), 315-21.
- Walker, B. A., Jacobson, M. A., Knight, D. A., Salvatore, C. A., Weir, T., Zhou, D., et Bai, T. R.** “Adenosine A3 receptor expression and function in eosinophils.” (1997a). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16(5), 531-7.
- Walker, B. A., Rocchini, C., Boone, R. H., Ip, S., et Jacobson, M. A.** “Adenosine A2a receptor activation delays apoptosis in human neutrophils.” (1997b). *J Immunol*, 158(6), 2926-31.
- Wang, J., Nemoto, E., et Dennert, G.** “Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein.” (1996). *J Immunol*, 156(8), 2819-27.
- Wang, J., Nemoto, E., et Dennert, G.** “Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferase.” (1997). *Adv Exp Med Biol*, 419, 191-201.
- Wang, J., Nemoto, E., Kots, A. Y., Kaslow, H. R., et Dennert, G.** “Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase.” (1994). *J Immunol*, 153(9), 4048-58.
- Watt, W. C., Lazarowski, E. R., et Boucher, R. C.** “Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia.” (1998). *J Biol Chem*, 273(22), 14053-8.
- Webb, T. E., Feolde, E., Vigne, P., Neary, J. T., Runberg, A., Frelin, C., et Barnard, E. A.** “The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase.” (1996). *Br J Pharmacol*, 119(7), 1385-92.
- Weng, B., Thompson, W. C., Kim, H. J., Levine, R. L., et Moss, J.** “Modification of the ADP-ribosyltransferase and NAD glycohydrolase activities of a mammalian transferase (ADP-ribosyltransferase 5) by auto-ADP-ribosylation.” (1999). *J Biol Chem*, 274(45), 31797-803.

- Wiley, J. S., Dao-Ung, L. P., Li, C., Shemon, A. N., Gu, B. J., Smart, M. L., Fuller, S. J., Barden, J. A., Petrou, S., et Sluyter, R.** “An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor.” (2003). *J Biol Chem*, 13, 13.
- Wilson, H. L., Wilson, S. A., Surprenant, A., et North, R. A.** “Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus.” (2002). *J Biol Chem*, 277(37), 34017-23.
- Yamashita, Y., Hooker, S. W., Jiang, H., Laurent, A. B., Resta, R., Khare, K., Coe, A., Kincade, P. W., et Thompson, L. F.** “CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes.” (1998). *Eur J Immunol*, 28(10), 2981-90.
- Yang, F., Hicks-Berger, C. A., Smith, T. M., et Kirley, T. L.** “Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of residues in the apyrase conserved regions.” (2001). *Biochemistry*, 40(13), 3943-50.
- Yao, Y., Sei, Y., Abbracchio, M. P., Jiang, J. L., Kim, Y. C., et Jacobson, K. A.** “Adenosine A3 receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A3 antagonists.” (1997). *Biochem Biophys Res Commun*, 232(2), 317-22.
- Yegutkin, G. G., Henttinen, T., et Jalkanen, S.** “Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions.” (2001). *Faseb J*, 15(1), 251-260.
- Yegutkin, G. G., Henttinen, T., Samburski, S. S., Sychala, J., et Jalkanen, S.** “The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells.” (2002). *Biochem J*, 367(Pt 1), 121-8.
- Yoshida, K., et Kikutani, H.** “Genetic and immunological basis of autoimmune diabetes in the NOD mouse.” (2000). *Rev Immunogenet*, 2(1), 140-6.
- Yoshie, O., Imai, T., et Nomiyama, H.** “Chemokines in immunity.” (2001). *Adv Immunol*, 78, 57-110.
- Young, T. L., et Santella, R. M.** “Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine.” (1988). *Carcinogenesis*, 9(4), 589-92.
- Ziegler, M., et Oei, S. L.** “A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription.” (2001). *Bioessays*, 23(6), 543-8.
- Zimmermann, H.** “Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.” (2000). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 299-309.
- Zocchi, E., Daga, A., Usai, C., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Costa, A., Marchetti, C., et De Flora, A.** “Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells.” (1998). *J Biol Chem*, 273(14), 8017-24.
- Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Calder, L., et De Flora, A.** “Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity.” (1995). *FEBS Lett*, 359(1), 35-40.
- Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., Passalacqua, M., et De Flora, A.** “Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca²⁺ mobilization: role of NAD⁺ transport across cell membranes.” (1999). *Faseb J*, 13(2), 273-83.

Zubiaur, M., Guirado, M., Terhorst, C., Malavasi, F., et Sancho, J. “The CD3-gamma delta epsilon transducing module mediates CD38-induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells.” (1999). *J Biol Chem*, 274(29), 20633-42.