



HAL
open science

Modulation des activités du récepteur purinergique P2X7 au cours de l'activation des lymphocytes T

Hanaa Safya

► **To cite this version:**

Hanaa Safya. Modulation des activités du récepteur purinergique P2X7 au cours de l'activation des lymphocytes T. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T083 . tel-01412876

HAL Id: tel-01412876

<https://theses.hal.science/tel-01412876>

Submitted on 9 Dec 2016

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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :
BIOSIGNE

Laboratoire : *Signalisation Calcique et Interactions Cellulaires dans le foie*

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Hanaa SAFYA

Modulation des activités du récepteur purinergique P2X7 au
cours de l'activation des lymphocytes T

Date de soutenance : 08/12/2014

Composition du jury :

Président du jury	Karim BENIHOUD	Professeur, Université Paris-Sud
Rapporteurs	Sahil ADRIOUCH Sébastien ROGER	Maitre de Conférences, Université de Rouen Maitre de Conférences, Université François Rabelais de Tours
Examineurs	Géraldine SCHLECHT-LOUF Cécile DELARASSE	Maitre de Conférences, Université Paris-Sud Chargée de Recherche, INSERM, ICM, Paris
Directeur de thèse	Pierre BOBÉ	Professeur, Université Paris-Sud

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord le Pr. Karim Benihoud d'avoir accepté d'être président de mon jury de thèse. Je tiens également à remercier les Dr. Sahil Adriouch et Sébastien Roger d'avoir accepté d'expertiser mon travail et d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie aussi les Dr. Géraldine Schelcht-Louf et Cécile Delarasse d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie le Conseil National de la Recherche Scientifique-Liban qui m'a fait confiance en m'accordant la bourse doctorale et qui continue à faire tout, malgré l'instabilité politique et financière de notre pays, pour aider les doctorants libanais à l'étranger. Je voudrais plus spécialement remercier Dr. Charles Tabet qui, malgré la distance, était toujours disponible et très réactif pour répondre à mes mails.

La première année de cette thèse a eu lieu dans l'ancienne équipe CNRS UMR7592 « Inflammation, Gestation et Auto-immunité » sous la responsabilité du Dr. Colette Kanellopoulos, à l'Institut Jacques Monod, Paris. Les deux dernières années ont eu lieu dans l'équipe INSERM U757 « Signalisation Calcique et Interactions Cellulaires dans le Foie », dirigé par le Dr. Laurent Combettes à l'Université Paris-Sud, Orsay. Je remercie les Dr. Colette Kanellopoulos et Laurent Combettes de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires, pour leur écoute et leurs conseils scientifiques qui m'ont toujours été bénéfiques.

Un grand merci à toi Pierre. Depuis les cours de Master 1, tu m'as transmis ta passion pour l'immunologie. Tu as cru en moi et m'a initiée à la recherche scientifique. Tu ne t'es pas lassé de relire et corriger mes manuscrits. Ce qui a fait qu'en plus d'être mon prof d'Immuno, tu étais aussi mon prof de français ! Tu m'as encadrée avec beaucoup d'énergie et m'as toujours poussée à sortir le mieux de moi, à être autonome et à surmonter toutes les difficultés. Merci pour ta confiance, ton écoute et ta présence sur ce long chemin de thèse. Je n'oublierai pas nos fous rires sur les « pseudopodes... ».

Je remercie Jean Kanellopoulos d'avoir toujours été présent pour moi. Merci pour votre gentillesse, vos conseils scientifiques prodigieux et pour votre sens de l'humour. Vous avez toujours su clôturer nos réunions scientifiques avec des blagues drôles et les superbes mythologies grecques...

Je tiens à remercier mes anciens collègues : Sylvain, Philippe et Stéphane. Je remercie spécialement Mohcine pour sa patience, ses conseils et de m'avoir initiée à la culture cellulaire et la cytométrie en flux, cette technique qui me tient à cœur et qui m'a accompagnée tout au long de ce travail.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à mes collègues de l'unité INSERM U757 qui étaient adorables. Vous m'avez accueillie parmi vous et avez su rendre mon travail de thèse toujours agréable et mes journées toutes aussi plaisantes : Merci à Vanessa qui a ramené toute la beauté du Brésil avec elle à Orsay en 2013... *I won't forget our long experiments together, our little stories and jokes. I promise to visit you and Rafa soon, very soon...* Grand merci à toi Leïla pour ton écoute, tes conseils et surtout pour les bons « KitKat » que tu m'offrais pendant la longue période de rédaction !!! Tu as toujours été là pour moi et je te promets qu'on va passer des superbes vacances ensemble au Liban cette année ! Merci à Amine pour ta présence et ton aide. Je n'oublierai jamais notre « longue balade » de Gif à Orsay à 11:00 du soir !!! Merci à Boris pour ses discussions intéressantes avec toujours un petit côté philosophique. Merci à, Zhimin, Camille, Brigitte, les deux Isabelle D. et G., les deux Olivier F. et D., Sylvie, Sylviane, Doris, Oliver, Sophie, l'équipe « Thierry », Pascale, Kim, Claudine, Patricia et Kadi pour leur générosité, gentillesse et leurs conseils scientifiques au besoin. Merci à Mômô pour son coaching sportif et les délicieuses recettes de cuisine qu'elle m'a apprises!!

Un grand merci à Michel Lepoivre, mon tuteur, à Aimeric et Olivier pour leur gentillesse et leurs conseils scientifiques. Je remercie également Amel d'avoir accepté de m'aider à faire mes toutes premières expériences de cytométrie sur le partec et pour les délicieuses bières qu'on a bues ensemble©. Merci à toi Mickael Bourge pour ta disponibilité, ton aide et ta gentillesse.

Je voudrais également remercier tous mes amis: Sans vous, la vie en France aurait été moins agréable.

Un énorme merci à « *Mama w Baba* » qui, même s'ils sont loin de moi, m'entourent toujours de leur amour inconditionnel. Vous m'avez appris l'essentiel dans la vie et m'avez toujours soutenue dans mes choix de vie. Je vous en serais toujours reconnaissante.

Un grand merci à ma grande sœur, Mayssa, mes grands frères Zahi et Mazen et ma belle sœur Kinana pour leur amour et leur soutien. Un énorme bisou à mon neveu et ma nièce, « Dado » et « Touta ». Vous êtes ma joie et ma fierté.

Enfin, le dernier merci va à Tarek. Tu as adopté « mon P2X7 » et mes petites souris. Tu as toujours supporté mes sautes d'humeur pendant les moments de stress et su me consoler et me remonter le moral même pendant les moments difficiles. Nous avons vécu pleins de choses ensemble depuis 10 ans! Tu es le plus beau sourire que je porterai toute ma vie.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	4
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	5
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	11
1. LES ECTO-NUCLEOTIDASES	12
a) Les E-NTDPases	13
b) Les ecto-5'-nucleotidases/ CD73	13
c) Physiopathologie de la machinerie CD39/CD73	14
2. LA FAMILLE DES RECEPTEURS PURINERGIQUES P1	16
A. <i>Le récepteur A1</i>	18
a) Expression	18
b) Voies de signalisation	18
B. <i>Les récepteurs A_{2A} et A_{2B}</i>	18
a) Expression	18
b) Voies de signalisation	19
C. <i>Les récepteurs A₃ : expression et fonctions</i>	19
a) Expression	19
b) Voies de signalisation	19
D. <i>Physiopathologie des récepteurs P1</i>	20
3. LA FAMILLE DES RECEPTEURS PURINERGIQUES P2	24
A. <i>Les récepteurs P2Y couplés aux protéines G</i>	24
a) Expression	25
b) Voies de signalisation	25
c) Physiopathologies des récepteurs P2Y	25
B. <i>Les récepteurs ionotropiques P2X</i>	27
a) Structure des récepteurs ionotropiques P2X	28
b) Signalisation et expression des récepteurs P2X	30
i. Le récepteur P2X1	31
ii. Le récepteur P2X2	32
iii. Le récepteur P2X3	32
iv. Le récepteur P2X4	33
v. Le récepteur P2X5	34
vi. Le récepteur P2X6	34
vii. Le récepteur P2X7	35
4. LE RÉCEPTEUR P2X7	35
A. <i>Structure et propriétés pharmacologiques du P2X7R</i>	35
a) Les agonistes	37
i. L'ATP et ses dérivés	37
ii. Activation par ADP-ribosylation	37
iii. Autres agonistes du récepteur P2X7	39
b) Les antagonistes du récepteur P2X7	39
i. Les antagonistes chimiques	39
ii. Autres composés inhibant le récepteur P2X7	41
B. <i>Expression du récepteur P2X7</i>	41
C. <i>Activités cellulaires et physiologiques du récepteur P2X7</i>	42
a) Ouverture du canal ionique	42
b) Ouverture d'un pore non sélectif	45
c) Externalisation de la PS et mort cellulaire	48
d) Clivage des molécules transmembranaires: cas de la molécule CD62L	51
e) Maturation et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires	55
D. <i>Variants du récepteur P2X7</i>	58
a. Isoformes du récepteur P2X7	58
b. Polymorphismes du récepteur P2X7	61

E. Le récepteur P2X7 est-il capable de former des hétérodimères ?	62
5. P2X7 DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	63
A. P2X7 et immunité innée.....	64
B. P2X7 et immunité humorale et adaptative.....	66
a) La molécule CD69	70
b) La molécule CD45	71
c) La molécule CD44	73
d) Le récepteur P2X7 et les maladies du système immunitaire	77
OBJECTIF DU TRAVAIL DE THÈSE.....	79
RÉSULTATS.....	83
1. ARTICLE 1.....	84
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES.....	123
A. Formation du pore.....	123
B. Etude du clivage de la molécule CD62L par l'ATP dans les lymphocytes T en fonction de l'expression du marqueur CCR7.....	123
C. Etude de l'activation de la caspase-9 dans les sous-populations de lymphocytes T	123
D. Etude de la cinétique de l'influx calcique dépendant du récepteur P2X7	124
3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE 1.....	124
A. L'incorporation du YO-PRO-1 est indépendante de la mort cellulaire.....	124
B. La formation du pore est indépendante de la pannexine-1.....	125
C. Les lymphocytes T récemment activés sont les sous-populations les plus sensibles à l'apoptose	126
D. Sensibilité à l'influx calcique des sous-populations de lymphocytes T.....	128
E. Expression des marqueurs d'activation sur des lignées de lymphocytes T.....	128
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	130
A. DISSOCIATION DES ACTIVITES DEPENDANTES DU RECEPTEUR P2X7 SELON LE STADE D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T.....	131
B. SPECIFICITE DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LES ISOFORMES DE CD45	133
C. ETUDE DE LA SENSIBILITE DES TREG A L'ACTIVATION DU RECEPTEUR P2X7	134
D. FAIBLE SENSIBILITE DES LYMPHOCYTES T AU STADE EFFECTEUR/MEMOIRE AU CLIVAGE DE CD62L DEPENDANT DU RECEPTEUR P2X7	134
E. LA FORMATION DU PORE ET L'EXTERNALISATION DE LA PS PAR LES LYMPHOCYTES T AU STADE NAÏF ACTIVE SONT DEPENDANT DE LA SIGNALISATION CALCIQUE	135
F. ETUDE DES ACTIVITES CELLULAIRES DU RECEPTEUR P2X7 DES LIGNEES TUMORALES DE LYMPHOCYTES T	136
G. ETUDE DU MECANISME PAR LEQUEL LA MOLECULE B220 REGULE NEGATIVEMENT LE RECEPTEUR P2X7	136
ANNEXE.....	138
BIBLIOGRAPHIE.....	154

Listes des Figures et des Tableaux

FIGURE 1 : LES PRINCIPAUX NUCLEOTIDES ET ECTO-NUCLEOTIDASES.....	16
FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA FAMILLE DES RECEPTEURS P1	17
FIGURE 3 : STRUCTURE DES PRINCIPAUX ANALOGUES DE L'ATP	28
FIGURE 4 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE ET ORGANISATION DES RECEPTEURS P2X4 ET P2X1.	29
FIGURE 5 : MODELISATION DU RECEPTEUR P2X7 HUMAIN D'APRES LA CRISTALLOGRAPHIE.....	36
FIGURE 6 : CASCADE D'ADHESION DES LEUCOCYTES.....	52
FIGURE 7 : ACTIONS DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE SUR LE CLIVAGE DE LA MOLECULE CD62L ET L'EXTERNALISATION DE LA PS.....	54

FIGURE 8 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE CLIVAGE DE L'APP PAR LE RECEPTEUR P2X7.....	55
FIGURE 9 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA SYNTHÈSE ET LA SÉCRETION D'IL-1B.....	57
FIGURE 10 : ISOFORMES DU RECEPTEUR P2X7 HUMAIN ET MURIN	58
FIGURE 11 : STRUCTURE DU GÈNE ET SÉQUENCE EN ACIDES AMINES DU VARIANT K DU RECEPTEUR P2X7 .	60
FIGURE 12 : MÉCANISME D'ÉLIMINATION DES PARASITES INTRACELLULAIRES INDUIT PAR LE RECEPTEUR P2X7.....	66
FIGURE 13 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA MOLECULE CD69.	70
FIGURE 14 : STRUCTURE DE LA PHOSPHATASE DE MEMBRANE CD45.	72
FIGURE 15 : STRUCTURE DE LA MOLECULE CD44 HUMAINE.	74
FIGURE 16 : MODULATION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS D'ACTIVATION CD45RB, CD69, CD44 ET B220 A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T AU COURS DE L'ACTIVATION.....	75
FIGURE 17 : LE PORE DÉPENDANT DU RECEPTEUR P2X7 SE FORME INDÉPENDAMMENT DE LA MORT CELLULAIRE.	125
FIGURE 18 : LA FORMATION DU PORE P2X7 EST INDÉPENDANTE DE LA PANNEXINE-1.	126
FIGURE 19 : ACTIVATION DE LA CASPASE-9 DÉPENDANTE DU RECEPTEUR P2X7 DANS LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T.....	127
FIGURE 20 : CINÉTIQUE DE L'INFLUX CALCIQUE DANS LES LYMPHOCYTES T	128
FIGURE 21 : EXPRESSION DES MARQUEURS D'ACTIVATION CD44, CD45RB ET CD69 SUR LES LIGNÉES TUMORALES DE LYMPHOCYTES T EL4 ET BW5147.....	129
TABLEAU 1 : LA FAMILLE DE RECEPTEURS P2Y ET LEURS LIGANDS [106 ,111]	25
TABLEAU 2 : EXPRESSION TISSULAIRE ET SENSIBILITÉ À L'ATP DES RECEPTEURS P2X [55 ,155]	30
TABLEAU 3 : PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES DES RECEPTEURS P2X7 DE MAMMIFÈRES [201].....	37
TABLEAU 4 : LES DIFFÉRENTS ANTAGONISTES DU RECEPTEUR P2X7 ET LEUR IC ₅₀ CORRESPONDANTES [201]	40
TABLEAU 5 : SOUS-TYPES DE RECEPTEURS P2X ET LEUR DISTRIBUTION SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES .	64
TABLEAU 6: TABLEAU DÉCRIVANT LES PHÉNOTYPES DES DIFFÉRENTS STADES D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T	75
TABLEAU 7: TABLEAU RÉSUMANT LA MODULATION DES ACTIVITÉS DU RECEPTEUR P2X7 DANS LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T EN FONCTION DE LEUR STADE D'ACTIVATION	133

Liste des abréviations

ADA:	Adénosine Déaminase
ADP:	Adénosine 5'-diphosphate
AICD:	Activation induced-cell death
AMPe:	Adénosine 3'-5'-monphosphate cyclique
ARNm:	ARN messenger
ATP:	Adénosine-5'-triphosphate
BAK:	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
BAX:	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
B6:	Souris C57BL6
CMH:	Complexe majeure d'histocompatibilité
DC:	Cellules dendritiques
DN:	Lymphocyte T CD4 ⁻ CD8 ⁻ double négatif
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
HIV:	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IP3:	Inositol 1,4,5 triphosphate
IL-:	Interleukine
IFN:	Interféron
KO:	Souris rendue génétiquement déficiente ou Knock-out
Lck:	<i>Lymphocyte specific protein tyrosine kinase</i>
LPS:	lipopolysaccharide
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMP:	Matrix metalloproteinase
NAD:	Nicotinamide Adénine dinucléotide
NADPH:	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NF-κB:	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NFAT:	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
PKA:	Protéine kinase A
PKC:	Proteine kinase C
PLA₂:	Phospholipase A ₂

PLC:	Phospholipase C
PLD:	Phospholipase D
PS:	Phosphatidylsérine
Q-VD-OPh:	<i>(3S)-5-(2,6-Difluorophenoxy)-3-[[2S)-3-methyl-1-oxo-2-[(2-quinolinylcarbonyl) amino]butyl]amino]-4-oxo-pentanoic acid hydrate</i>
RE:	Réticulum endoplasmique
Sp1:	<i>Specific protein 1</i>
Src:	(du mot sarcoma) <i>Protéine kinase proto-oncogène</i>
Tc:	Lymphocyte T cytotoxique
TCR:	<i>T- cell-receptor</i>
TLR:	<i>Toll-Like receptor</i>
TNF:	<i>Tumor necrosis factor</i>
Trég:	Lymphocytes T régulateurs
UDP:	Uridine diphosphate
UTP:	Uridine triphosphate
WT:	Souris sauvage ou wild-type

*« L'esprit humain traite une nouvelle idée de la même manière que son corps
le ferait d'une protéine étrange; il la rejette. »*

Sir Peter Medawar

Le récepteur P2X7, qui est l'un des sept membres de la famille des récepteur canaux P2X, se caractérise par une faible affinité à l'ATP le rendant sensible uniquement à de fortes concentrations en ATP ($EC_{50} > 150 \mu M$), une inaptitude à se désensibiliser et une longue partie C-terminale. Tout comme les autres récepteurs P2X, l'activation du récepteur P2X7 induit un influx calcique et un efflux de potassium. La particularité du récepteur P2X7, ainsi que des récepteurs P2X2 et P2X4, est sa capacité à former un pore perméable aux molécules de taille comprise entre 400 et 900 Da selon le type cellulaire. Il est principalement exprimé sur les cellules immunitaires dans lesquelles il est impliqué dans des fonctions essentielles comme l'activation, la prolifération et la mort cellulaire. Son activation entraîne la dégranulation des mastocytes et la maturation et la sécrétion de l'IL-1 β par les macrophages et les cellules dendritiques. La stimulation du récepteur P2X7 induit l'activation des métalloprotéases responsables du clivage de protéines membranaires comme la L-sélectine (ou CD62L) impliquée dans le homing des leucocytes et par conséquent leur extravasation à travers l'endothélium vasculaire. Dans les lymphocytes T, l'influx calcique induit par l'ATP entraîne la translocation du facteur de transcription NFAT (ou *Nuclear Factor of Activated T-cells*) dans le noyau ce qui déclenche la transcription du gène de l'IL-2 et par conséquent la prolifération des lymphocytes T. Une activation prolongée par l'ATP peut induire la mort cellulaire.

Notre équipe a récemment montré que les lymphocytes T effecteurs pré-apoptotiques, caractérisés par l'expression de l'isoforme B220 (ou CD45RABC) de la tyrosine phosphatase de membrane CD45, perdent l'expression membranaire du récepteur P2X7 ce qui entraîne une résistance à l'activation par l'ATP. En revanche, peu est connu sur la sensibilité à l'ATP des lymphocytes T aux stades d'activation antérieurs. Qui plus est, des résultats contradictoires ont été publiés.

L'objectif de ce travail de thèse était donc d'évaluer et de comparer la sensibilité à l'ATP des sous-populations de lymphocytes T aux différents stades d'activation et de différenciation (naïf, récemment activé, effecteurs/mémoires) et cela aussi bien dans les lymphocytes T conventionnels que régulateurs (Foxp3⁺). Pour ce faire, j'ai privilégié la technique de cytométrie en flux pour principalement deux raisons : la première étant la possibilité d'étudier les différentes sous-populations de lymphocytes T grâce à l'utilisation simultanée de plusieurs anticorps dirigés contre différents marqueurs d'activation et de différenciation ; la deuxième était la possibilité d'étudier, par des anticorps ou bien des sondes fluorescentes, les activités cellulaires induite par le récepteur P2X7 dans une sous-population de lymphocyte T à un stade donné d'activation ou de différenciation.

Ce travail a révélé une caractéristique restée jusque là inconnue du récepteur P2X7, à savoir que, contrairement à ce qui a été affirmé par plusieurs groupes, les activités cellulaires du récepteur P2X7 ne sont pas toutes exécutées dès que le récepteur P2X7 est activé, mais qu'elles sont dissociées et que leur exécution dépend du stade d'activation ou de différenciation du lymphocyte T.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système immunitaire est constamment exposé à des signaux de danger, qui sont définis comme les éléments, d'origine infectieuse ou non, potentiellement délétères pour l'hôte. L'ATP lorsqu'il passe dans le compartiment extracellulaire est considéré comme un tel signal. L'ATP extracellulaire, ainsi que les nucléotides ADP, UTP ou UDP, jouent un rôle clé dans de nombreuses fonctions physiologiques en activant différentes familles de récepteurs purinergiques P2 dont le récepteur P2X7. Celui-ci est exprimé sur toutes les cellules immunitaires et joue un rôle important à la fois dans leur activation, leur prolifération et la sécrétion des médiateurs inflammatoires [1]. L'ATP se trouve en forte concentration dans le compartiment intracellulaire (3 à 10 mM) alors que sa concentration extracellulaire est très faible (400 à 700 nM). Dans certains types cellulaires (neurones, plaquettes), il est concentré au niveau de vésicules sécrétoires. Cette différence de concentration d'ATP entre les deux compartiments est due à son hydrolyse séquentielle en ADP, puis en AMP et finalement en adénosine par des ecto-nucléotidases ou ecto-ATPases exprimées à la surface cellulaire [2, Bours, 2006 #579]. L'ATP peut être libérée par exocytose dans l'espace synaptique en même temps que des neuromédiateurs comme les catécholamines. Dans un contexte inflammatoire, l'ATP se trouve libéré en forte quantité dans le milieu extracellulaire suite à des altérations cellulaires, en cas d'hypoxie des cellules, ou bien après l'activation des cellules immunitaires.

En 1929, Drury et Szent-Györgyi ont proposé un rôle des purines dans la signalisation cellulaire. Ils ont montré que des injections intraveineuses d'extraits de muscles cardiaques, de cerveau, de rate et de reins ont des effets sur le rythme cardiaque et atténuent la vasodilatation artérielle [3]. En 1934, Gillespie a décrit que la déamination de l'ATP réduit son activité et change le type de la réponse cellulaire [4]. Cela fut la première mise en évidence de deux types de réponses différentes, l'une à l'ATP et l'autre à l'adénosine, et donc de l'indication de l'existence de différents types de récepteurs purinergiques. Il a fallu attendre 1978, pour que Burnstock [5] définisse formellement les récepteurs purinergiques en proposant qu'ils soient divisés en deux familles de récepteurs appelées : P1 et P2. Les récepteurs P1 et P2 sont activés, respectivement, par l'adénosine et l'ATP.

1. Les ecto-nucléotidases

Les ecto-nucléotidases appartiennent à plusieurs familles d'enzymes capables d'hydrolyser les nucléotides qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Exprimées par les cellules immunitaires, elles jouent un rôle important dans la réponse immunitaire en l'activant ou l'inhibant.

La quantité basale d'adénosine extracellulaire est de l'ordre de 30 à 200 nM [6]. Elle est générée à partir de la dégradation de l'ATP extracellulaire en AMP par la diphosphohydrolase nucléoside triphosphate CD39 [7] puis l'ecto-5'-nucléotidase CD73 qui déphosphoryle l'AMP en adénosine [8]. L'ATP peut également être convertie en ADP sous l'action de l'ecto-nucléotidase CD39L1 [9]. Les sources d'ATP extracellulaires sont multiples notamment suite à un dommage de la membrane cellulaire lors de la nécrose qui contribuent à des concentrations locales de 4 à 5 fois supérieures à la normale, la sécrétion

à travers les héli-canaux de type connexine/pannexine [10] ou encore par le récepteur canal P2X7 [11].

Du fait de leur forte expression sur les cellules immunitaires et en particulier sur les lymphocytes T, nous allons nous intéresser uniquement aux deux molécules CD39 et CD73 (*cf. Figure 1*).

a) Les E-NTDPases

Capables d'hydrolyser les nucléosides di ou tri-phosphate mais pas les mono phosphates, l'activité des E-NTDPases nécessitent des concentrations millimolaires de calcium et de magnésium. La molécule CD39, prototype de cette famille composée de huit membres, est exprimée dans la rate, les poumons, le thymus, et le placenta et à la membrane des cellules du muscle lisse, l'endothélium vasculaire et les cellules immunitaires [12]. Son expression est régulée par plusieurs facteurs de transcription dont Sp1 (*specific protein 1*), STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et Gf1-1 (*zinc finger protein growth factor independent-1 transcription factor*) [13] lors de l'inflammation, l'ischémie, l'hypoxie ou encore dans des tumeurs [14,15]. L'existence d'une forme soluble de CD39 a été récemment rapportée dans des sérums humain et murin [16].

La molécule CD39 se compose de deux segments transmembranaires reliés entre eux par un grand domaine extracellulaire hydrophobe contenant une région avec un motif de liaison au phosphate (appelé DXG) présentant l'activité catabolique et d'un domaine cytoplasmique comprenant les extrémités COOH et NH₂ terminales de petites tailles [17].

b) Les ecto-5'-nucleotidases/ CD73

Cette famille qui est impliquée dans l'hydrolyse de l'AMP en adénosine se compose de sept membres avec cinq d'entre eux localisés dans le cytosol, un dans la matrice mitochondriale et un à la membrane plasmique (CD73). La molécule CD73 est composée d'un dimère de deux sous-unités identiques ancrées à la membrane plasmique. La molécule CD73 peut être clivée de la membrane par un mécanisme impliquant la phospholipase C (PLC) [18]. La molécule CD73 est exprimée à la surface de plusieurs cellules dont les cellules endothéliales, les cellules du muscle lisse, les cellules pancréatiques, les DC, et plus particulièrement à la surface des lymphocytes T et B circulants avec une expression qui est strictement liée au stade de maturation de ces cellules [9]. En effet, il a été montré, à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de CD73, que l'expression de cette molécule est restreinte aux lymphocytes B qui ont subi la commutation de classe des immunoglobulines (Ig). D'autre part, l'expression de CD73 est très faible sur les lymphocytes T immatures puis elle augmente avec le stade de maturation des lymphocytes T périphériques avec cependant des différences d'expression selon le type de sous-populations [16]. Les autres types de cellules sanguines comme les neutrophiles, les érythrocytes et les plaquettes n'expriment que peu voire pas les molécules CD73. L'expression de CD73 est augmentée dans des contextes hypoxiques et pro-inflammatoires en présence de cytokines comme le TGF- β , l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-1 β et les prostaglandines [19].

c) Physiopathologie de la machinerie CD39/CD73

Décrite initialement comme un marqueur d'activation des cellules lymphoïdes, la molécule CD39 possède, en collaboration avec la molécule CD73, une fonction immunosuppressive [20]. Les souris déficientes pour la molécule CD39 montre un rôle important de cette molécule dans la prévention d'une réponse immunitaire exacerbée, par exemple, de la peau contre des irritants chimiques [21] ou dans le blocage de l'angiogénèse tumorale et la formation de métastase. En effet, il a été montré que le récepteur P2Y2 colocalise avec l'intégrine α ($\alpha_v\beta_3$) à la surface des cellules endothéliales. L'activation des intégrines induit la phosphorylation de la protéine d'adhérence focale FAK (*focal adhesion kinase*) qui active à son tour la protéine ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases-1 and 2*) ce qui favorise l'angiogénèse et la prolifération en bloquant l'apoptose [22].

La machinerie CD39/CD73 participe aux fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs (Trég) par l'intermédiaire de deux mécanismes : la dégradation de l'ATP et l'activation des récepteurs A_{2A} suite à la production, en collaboration avec la molécule CD73, de l'adénosine. L'activité des molécules CD39 et CD73 est strictement corrélée à l'état d'activation des Trég. En effet, l'hydrolyse de l'ATP par les lymphocytes Trég de souris a été observée suite à leur stimulation par le TCR (ou *T cell receptor*) mais pas sur des lymphocytes Trég non activés [20]. Récemment, il a été proposé que les lymphocytes Trég humains puissent sécréter la molécule CD73 sous une forme soluble capable de dégrader l'AMP en adénosine [23]. Chez l'Homme, l'expression de la molécule CD39 est retrouvée sur environ 90% des lymphocytes Trég de type effecteur/mémoire (T_{REM}).

L'implication de la machinerie CD39/CD73 dans le développement des maladies auto-immunes a été montrée notamment dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), qui est le modèle murin de sclérose en plaques, et dans la polyarthrite rhumatoïde. Il a été rapporté que l'activité ecto-5'-nucléosidase est impliquée dans le mécanisme d'action du methothréxate et du sulfasalazine, deux anti-inflammatoires utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde [24]. Chez des patients atteints de sclérose en plaques, l'expression de CD39 est diminuée lors des poussées de la maladie qui pourraient donc être la conséquence d'une réduction de l'activité des lymphocytes Trég [25]. D'autre part, le rôle de CD73 est controversé dans la sclérose en plaques. Les résultats obtenus chez la souris montrent que CD73 a des effets neuro-inflammatoires [23]. Les souris déficientes pour la molécule CD73 sont résistantes à l'induction de l'EAE et présentent une moindre infiltration de lymphocytes T dans le système nerveux central que les souris sauvages (ou *wild type*, WT) grâce à l'inhibition de l'expression de la chimiokine membranaire CX3CL1 (*chemokine C-X3-C motif ligand 1*) dans le cerveau [26,27]. A l'inverse, et de façon surprenante, il semble que chez l'Homme, la molécule CD73 présente des effets bénéfiques lors du traitement par l'IFN- β des patients souffrant de sclérose en plaques [28]. L'IFN- β quand à lui agirait en bloquant la différenciation des lymphocytes Th17. Chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, il a été rapporté que les lymphocytes T CD4⁺ isolés du liquide synovial expriment de forts taux de CD39. Dans ces lymphocytes on retrouve deux populations : une population de lymphocytes Trég exprimant Foxp3 avec un phénotype immunosuppresseur et une population Foxp3 négatif de phénotype mémoire incapable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs

responsables de la maladie mais capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires de type IL-2, IL-17 et IFN- γ [29].

Plus récemment il a été montré que l'adénosine produite par les lymphocytes Trég inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) dans les lymphocytes T effecteurs par l'intermédiaire du récepteur A_{2A} ce qui réduit la production des cytokines pro-inflammatoires [30]. D'autre part, les souris déficientes pour la molécule CD39 montrent un rôle important de cette molécule dans la prévention d'une réponse immunitaire exacerbée de la peau contre des irritants chimiques [21]. Une autre équipe a rapporté que les Trég de souris déficientes pour la molécule CD39 présentent une activité suppressive réduite et par conséquent ne sont pas capables d'inhiber les activités effectrices de lymphocytes T activés et donc de bloquer le rejet de greffe [31]. Les souris déficientes en CD73 montrent que cette molécule joue, par l'intermédiaire du A_{2A}R, un rôle protecteur dans l'inflammation aiguë des poumons [32] et dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire [33]. Plus récemment il a été montré que les molécules CD39 et CD73 sont surexprimées dans les mélanomes humains et les carcinomes mammaires [34] suggérant que la production d'adénosine est un moyen d'échappement des cellules tumorales à l'immunité adaptative. Des stratégies d'inhibition de la molécule CD73, par des antagonistes ou bien des anticorps monoclonaux, permettent de stimuler l'immunité adaptative pour un meilleur contrôle de la progression tumorale [23].

Une expression élevée des molécules CD39 et CD73 a été décrite dans des situations infectieuses impliquant différents microorganismes ce qui suggère que la production d'adénosine est un moyen pour ces microorganismes d'échapper à la réponse immunitaire soit en inhibant la phagocytose par les cellules immunitaires comme dans le cas de *Candida parapsilosis* et *Staphylococcus aureus* [35,36] soit en facilitant l'entrée dans la cellule hôte du microorganisme, et donc permettre une meilleure survie, comme dans le cas de *Streptococcus sanguinis* et *Legionella pneumophila* [37,38]. A l'inverse, d'autres travaux ont décrit un rôle protecteur des ecto-nucléotidases contre l'infection bactérienne notamment dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette équipe a montré que les souris transgéniques surexprimant la molécule CD39 humaine développent une réponse inflammatoire accrue leur permettant d'éliminer des bactéries [39]. Ces travaux suggèrent que le développement d'inhibiteurs ou d'activateurs pharmacologiques de la machinerie CD39/CD73 pourrait être un nouveau moyen de traitement des maladies infectieuses.

Récemment le rôle des molécules CD39 et CD73 a été étudié dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. Le modèle murin de cette maladie induit par le DSS (ou sulfate de dextran sous forme de sel de sodium) a montré que la déficience en CD39 [40] et CD73 [41] est associée à une forme sévère de la maladie avec une forte sécrétion de cytokines IL-1 β et TNF- α . D'autre part chez l'Homme, une diminution de l'expression de CD39 est associée à la maladie de Crohn [41]. Ce qui suggère un rôle protecteur de la machinerie CD39/CD73 dans ces maladies.

Dans un modèle murin de diabète induit par l'injection de streptozotocine, un produit chimique toxique pour les cellules β sécrétrices d'insuline, il a été montré que les

INTRODUCTION

souris déficientes pour la molécule CD39 présentent une sensibilité accrue au diabète et que la reconstitution de ces souris par la moelle osseuse de souris WT réduit l'intensité de la maladie. A l'inverse, les souris transgéniques surexprimant la molécule CD39 sont protégées contre le diabète, présentent une faible infiltration de lymphocytes T dans les îlots β de Langerhans du pancréas et que cette protection est réduite suite à l'administration d'inhibiteurs des récepteur A_{2A} et A_{2B} [42]. Chez les patients diabétiques, il a été observé une augmentation de l'expression de P2X7R ainsi que de l'expression et de l'activation de CD39 sur les cellules mononucléaires du sang [43].

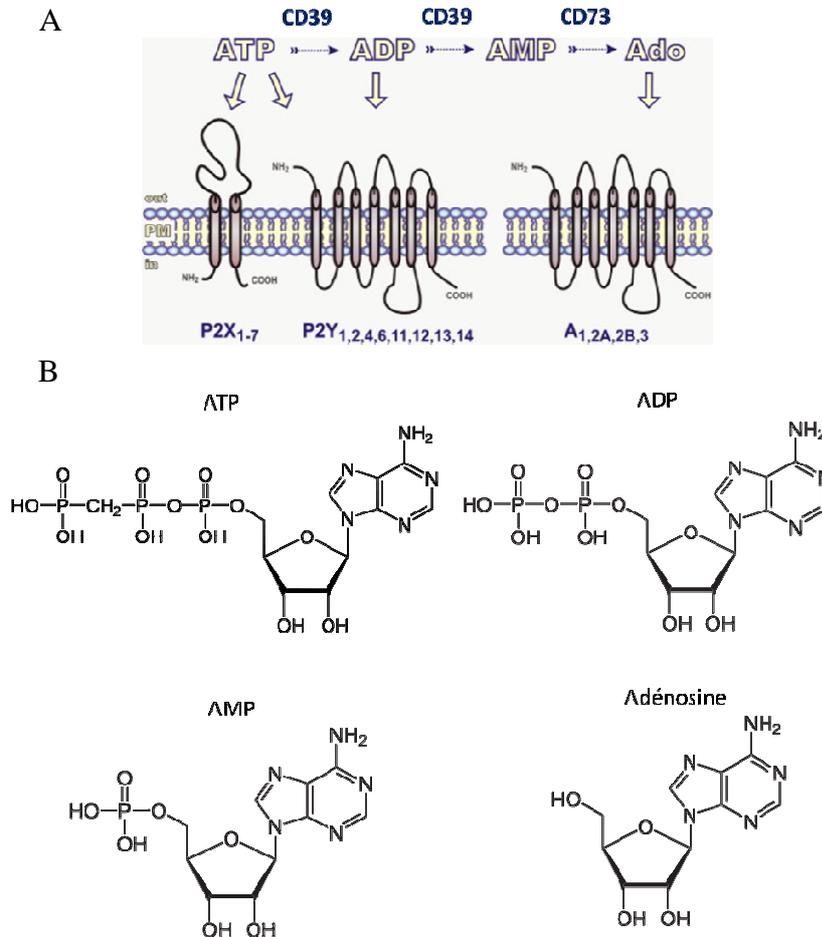


Figure 1 : Les principaux nucléotides et ecto-nucléotidases

A. Cascade d'hydrolyse des nucléotides par les ecto-nucléotidases et leurs différentes cibles d'action de récepteurs purinergiques (modifié d'après [9]). **B.** Structures chimiques des nucléotides.

2. La famille des récepteurs purinergiques P1

Dans le système nerveux central, l'adénosine présente une activité duelle au niveau synaptique et non synaptique selon le type de récepteur P1 engagé. Au niveau synaptique, l'adénosine se trouve dans les zones pré-synaptiques ou post-synaptiques afin de moduler les neurotransmetteurs par l'intermédiaire de l'enzyme adénylate cyclase qui active la protéine kinase A (PKA) [44]. D'autre part l'adénosine joue un rôle dans la plasticité synaptique induite par l'influx calcique [45]. Au niveau non synaptique, l'adénosine présente un rôle dans l'homéostasie. En effet, l'adénosine est aussi connue comme neuroprotecteur dans l'ischémie, l'hypoxie et le stress oxydant en inhibant la transmission synaptique limitant ainsi la propagation du dommage cellulaire [46].

INTRODUCTION

Dans le système cardiovasculaire, l'adénosine cause une vasodilatation par la sécrétion d'oxyde nitrique suite à un influx calcique dans les muscles lisses et les cellules endothéliales [47]. Dans le système immunitaire, l'adénosine inhibe l'activation des lymphocytes T et la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-2, IL-5, IFN- γ ...) en phosphorylant le facteur de transcription NF- κ B [48,49].

La famille des récepteurs purinergiques P1 se décompose en 4 sous-types de récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃. Comme tous les récepteurs couplés aux protéines G, ils possèdent sept segments membranaires (*cf. Figure 2*).

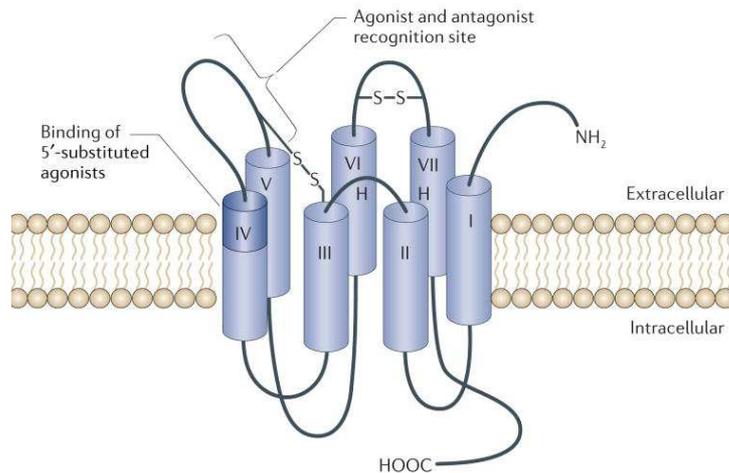


Figure 2 : Structure de la famille des récepteurs P1

Les récepteurs P1 se composent de sept segments transmembranaires (TM I à TM VII) liés entre eux par trois boucles extracellulaires et trois boucles cytoplasmiques. Les boucles liant TM IV à TM V et celles liant TM V à TM VI sont les plus longues. La partie N-terminale est située du côté extracellulaire et la partie C-terminale du côté cytoplasmique. La poche formée par trois hélices α forme le domaine de fixation du ligand. S-S représente les ponts disulfures. D'après [50].

Les récepteurs A₁ et A_{2A} possèdent une plus forte affinité pour l'adénosine que les récepteurs A₃ et A_{2B} [46]. Dans certains tissus, les récepteurs P1 sont exprimés simultanément. Cela pose la question d'une éventuelle interaction entre eux. Il a ainsi été rapporté que des récepteurs A₁ et A_{2A}R peuvent former des homodimères ou des hétérodimères entre eux [51] ou avec d'autres récepteurs couplés aux protéines G comme le récepteur à la dopamine ou à la rhodopsine [52]. Les récepteurs A₁ peuvent aussi former des hétérodimères avec certains des récepteurs à l'ATP de la famille P2 comme P2Y1 ou P2Y2. En effet dans le cas de l'hétérodimère A₁/P2Y1, l'activation par un agoniste spécifique de P2Y1, l'adénosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), induit une réponse caractéristique du récepteur A₁ [53]. Cependant, les techniques de transfert d'énergie et d'immunoprécipitation utilisées dans ces études pour mettre en évidence ces interactions entre récepteurs ont été critiquées car elles ont été réalisées après transfection de lignées cellulaires n'exprimant pas les récepteurs. L'oligomérisation observée pourrait être un artefact due à la solubilisation par les détergents [46].

A. Le récepteur A₁

a) Expression

Le récepteur A₁ est fortement exprimé dans le système nerveux central (hippocampe, cortex cérébral, cervelet, noyaux gris centraux) comme le montre des expériences d'immuno-histochimie utilisant un sérum polyclonal de lapin dirigé contre une région du récepteur A₁ conservée chez l'Homme et la souris [54]. Dans les autres tissus, les taux d'expression en récepteurs A₁ varient de très faibles (poumon, reins et intestin grêle) à moyens (cœur, foie, vessie, tissus adipeux et testicules) [55,56]. Ces taux d'expression peuvent être augmentés suite à l'activation du facteur de transcription NF-κB par les espèces réactives d'oxygène dans la lignée de cellules de muscle lisse DDT1-MF2 [57].

b) Voies de signalisation

La voie de signalisation, la mieux connue, induite par les récepteurs A₁ est celle de l'inhibition de l'adénylate cyclase du fait de son couplage avec la protéine Gi ce qui entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en AMP cyclique, un second messager impliqué dans de nombreuses voies de signalisation [58]. Cependant, les récepteurs A₁ sont également retrouvés couplés aux protéines Gq ce qui leur permet d'activer la PLC et donc la production des seconds messagers diacylglycérol et d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). La production d'IP₃ entraîne une libération de calcium dans le cytoplasme à partir du réticulum endoplasmique qui est responsable de l'activation de protéines kinases dont la protéine kinase C (PKC) comme cela a été montré pour la première fois dans les cellules ovariennes de Hamster chinois transfectées par le récepteur A₁ humain [59]. La PKC active à son tour des facteurs de transcription comme NF-κB, NFAT et la voie des MAP kinases (ou *Mitogen Activated Proteine Kinase*).

B. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B}

a) Expression

Les deux isoformes du récepteur A₂ présentent une différence d'affinité à l'adénosine : le récepteur A_{2A} étant plus affin que le récepteur A_{2B}. Le récepteur A_{2A} est caractérisé par une partie C-terminale plus longue et son couplage à la protéine G par la partie N-terminale de la troisième boucle intracellulaire. Les isoformes du récepteur A₂ présentent également une expression tissulaire différente. Les récepteurs A_{2A} sont fortement exprimés dans les leucocytes, les plaquettes, le système nerveux central, l'endothélium et le muscle vasculaire lisse. L'expression des récepteurs A_{2B} est presque ubiquitaire mais avec des taux différents en fonction des tissus. Ainsi leur expression est faible au niveau du système nerveux mais ils sont fortement exprimés dans le colon, l'œil, la vessie et les poumons. De même que les récepteurs A_{2A}, les récepteurs A_{2B} sont exprimés sur les mastocytes humains. Le récepteur A_{2A} est le sous-type de récepteur à l'adénosine préférentiellement retrouvé sur les lymphocytes T. En revanche, les deux récepteurs A_{2A} and A_{2B} sont présents sur les cellules présentatrices d'antigène (APC) [60].

Il faut d'ailleurs noter, que les 4 sous-types de récepteurs à l'adénosine sont présents sur les cellules dendritiques (DC) mais que leurs niveaux d'expression varient en fonction de leur origine et état d'activation. Les DC immatures expriment les récepteurs A_1 , A_{2A} et A_3 mais pas les A_{2B} alors que les DC matures expriment uniquement les récepteurs A_{2A} . De plus, la maturation des DC s'accompagne d'une diminution des taux d'ARN messagers des récepteurs A_1 et A_3 . Les récepteurs A_1 et A_3 sont impliqués dans le chimiotactisme des DC suite à une libération du calcium intracellulaire induisant une polymérisation de l'actine.

D'autre part, il a été montré que les taux d'expression des récepteurs A_{2A} peuvent être augmentés par le facteur de transcription NF- κ B. L'activation de NF- κ B peut être induite par deux voies différentes selon le type cellulaire : par le lipopolysaccharide (LPS) dans les macrophages et les neutrophiles humains et murins lors de l'inflammation induite par la stimulation par le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) [61]. En revanche et dans la lignée de cellules épithéliales humaines A549, l'activation de NF- κ B passe par la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α [62].

b) Voies de signalisation

La stimulation des récepteurs A_{2A} induit, par l'intermédiaire de la protéine Gs, l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc à partir de l'ATP. La présence d'AMPc induit l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui à son tour phosphoryle des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Dans les lymphocytes T la PKA collocalise avec le complexe TCR/CD3 pour inhiber la prolifération du lymphocyte T induite par l'activation du TCR en phosphorylant la Src kinase (ou *sarcome kinase*) qui à son tour inhibe la kinase Lck (ou *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) impliquée dans l'activation des lymphocytes T [60]. Des voies de signalisation indépendantes de l'AMPc, médiées par le récepteur A_{2A} , ont aussi été décrites notamment dans les neutrophiles. L'activation du $A_{2A}R$ induit l'activation de la protéine phosphatase-1 (PP1) qui déphosphoryle la sous-unité adaptatrice p47^{Phox} de la NADPH-oxydase inhibant par conséquent la génération de l'anion superoxyde dans les neutrophiles humains activés par le FMLP [63].

C. Les récepteurs A_3 : expression et fonctions

a) Expression

Les récepteurs A_3 ont été découverts après les récepteurs A_1 et A_2 [64]. L'ARNm du récepteur A_3 présente une large distribution cellulaire avec une forte expression dans les testicules de rat [65]. Chez l'Homme la plus grande quantité d'ARNm du récepteur A_3 est détectée dans les poumons et le foie [66].

b) Voies de signalisation

Les récepteurs A_3 , tout comme les récepteurs A_1 , inhibent l'adénylate cyclase du fait de leur couplage à la protéine Gi et induisent une libération calcique intracellulaire par l'intermédiaire de la production de l'IP3. Il a été montré chez le rat, mais pas chez

l'Homme, que le gène du récepteur A_3 subit un épissage alternatif pour donner naissance à une isoforme appelé A_{3i} . Cette isoforme présente une insertion de 17 acides aminés dans la seconde boucle intracellulaire. Cependant, cette isoforme est moins efficace que la forme classique A_3 pour inhiber l'AMPc [67].

D. Physiopathologie des récepteurs P1

Les récepteurs à l'adénosine, du fait de leur capacité à augmenter (A_{2A} et A_{2B}) ou à diminuer (A_1 et A_3) les taux de production d'AMPc, régulent un grand nombre de processus physiologiques dont le rythme cardiaque, la vasodilatation et la vasoconstriction des vaisseaux, l'inflammation, le remodelage du tissu osseux ou encore la stimulation (A_2) ou l'inhibition (A_1) de la libération de neuromédiateurs (glutamate, acide γ -aminobutyrique (GABA), acétylcholine, dopamine). Il a ainsi été décrit, dans un modèle de rat présentant des convulsions induites par le pentylènetétrazole que les effets anticonvulsifs de l'adénosine passaient par l'inhibition de la production d'AMPc dont les effets épiléptogéniques sont liés à sa capacité à stimuler des neuromédiateurs excitateurs de type glutamate et acétylcholine [68]. Les souris déficientes pour le récepteur A_1 montrent qu'il est impliqué dans la neuroprotection contre l'hypoxie et dans la sensibilité à la douleur. Bien que ces souris présentent un développement normal, elles montrent une augmentation des signes d'anxiété et des hyperalgésies par rapport aux souris WT [69]. Les souris déficientes pour le récepteur A_1 présentent également une augmentation importante de leur masse osseuse suite à un déficit de résorption du tissu osseux par les ostéoclastes ce qui indique que l'adénosine joue un rôle important dans la formation et la fonction de ces cellules [70].

Des polymorphismes dans les récepteurs P1 sont associés à des maladies neurologiques, à des différences de sensibilité aux effets de la caféine sur le sommeil (récepteur A_{2A}) [71] ou encore à l'hypersensibilité à l'aspirine qui se manifeste par des urticaires induites par l'aspirine (AIU ou *Aspirine Induced Urticaria*) ou par la triade de Widal (AERD ou *Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease*) associant à la fois asthme, polyposse naso-sinusienne et intolérance à l'aspirine. Cette hypersensibilité peut être due au mécanisme d'action de l'aspirine qui interfère avec le métabolisme de l'adénosine et donc inhibe l'enzyme adénosine désaminase qui catabolise l'adénosine, ce qui conduit à une accumulation de l'adénosine qui active, par les récepteurs A_{2B} et A_3 , la sécrétion d'histamine par les mastocytes de la peau [72]. Des polymorphismes dans les gènes A_1 et A_3 sont également associés à des maladies cardiaques notamment dans la gravité de l'infarctus chez des patients ayant des antécédents d'ischémie dans les artères coronaires et les ventricules [73].

L'adénosine lui-même pourrait jouer un rôle important dans le développement de certaines pathologies comme l'asthme. Des taux élevés en récepteurs A_1 ont été décrits sur des biopsies bronchiales de patients asthmatiques comparés aux sujets sains [74]. D'autre part, des taux élevés d'adénosine sont retrouvés dans les bronches au cours d'atteintes pulmonaires. Contrairement aux sujets sains chez lesquels il est sans effet, les asthmatiques répondent à l'adénosine par une broncho-constriction. En 2010, une étude

clinique de phase I a été menée chez des sujets asthmatiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement par inhalation d'un oligonucléotide anti-sens (RASON : *Respirable Antisense Oligonucleotide*) dirigé contre le récepteur A₁. Les résultats de cette étude ont montré que le RASON diminue les scores des symptômes de l'asthme et présente des effets bénéfiques par rapport aux médicaments broncho-dilatateurs. L'étude clinique de phase II n'a cependant pas réussi à montrer que RASON présentait pour les sujets asthmatiques un avantage thérapeutique supérieur aux corticoïdes inhalés [75]. D'autres études cliniques ont été conduites pour évaluer l'efficacité de traitement ciblant l'adénosine et/ou ses récepteurs. Des analogues de l'adénosine reconnaissant sélectivement le récepteur A₁ ont ainsi été produits dont le Tecadenoson qui a passé avec succès une étude clinique de phase 3 dans la tachycardie paroxystique supra ventriculaire [76]. Présentant des effets anti-lipolytiques, le récepteur A₁ est aussi une cible thérapeutique potentielle dans le diabète type II puisque la résistance à l'insuline observée dans ce type de diabète est liée à une lipolyse importante et des taux élevés d'acide gras circulant. Les agonistes des récepteurs A₁ sont ainsi capables d'induire une forte diminution des taux de triglycérides et de restaurer une certaine sensibilité à l'insuline. Ces agonistes, selon leur forme chimique, peuvent présenter des effets secondaires indésirables en particulier sur le cœur [77].

L'adénosine, en tant que molécule anti-inflammatoire, exerce par l'intermédiaire du récepteur A_{2A} un rétrocontrôle négatif sur l'activité des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes et cela afin de limiter l'intensité de l'inflammation et des dommages tissulaires qui lui sont associés. L'adénosine inhibe ainsi l'activation et l'extravasation des lymphocytes vers les tissus infectés ou lésés par une action combinée sur les lymphocytes T, les cellules présentatrices d'antigène et l'endothélium. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B}, ainsi que les enzymes qui contrôlent le métabolisme de l'adénosine, sont rapidement induits en réponse à une inflammation ou une hypoxie. La stimulation des récepteurs A_{2A} inhibe la production de cytokine de type inflammatoire, ainsi que les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (de type Th1 et Tc1) [78]. Dans un modèle murin de colite, il a été rapporté que l'administration d'un agoniste du récepteur A_{2A}R (ATL202) protège contre la maladie en réduisant les taux d'ARNm codant les cytokines pro-inflammatoires IFN- γ , TNF- α et IL-2 [79]. De même, le transfert des lymphocytes T CD4⁺ CD45RB^{low} ou CD25⁺ provenant de souris A_{2A}^{-/-}, qui contient la sous-population de lymphocytes Trég, ne protège pas les souris C57BL/6 (B6) SCID d'une colite causée par l'injection de lymphocytes T CD4⁺ CD45RB^{high} contrairement au transfert de la même sous-population de lymphocytes Trég provenant de souris WT. A l'inverse, ce rôle immuno-régulateur de l'adénosine peut avoir des conséquences négatives sur le contrôle de certaines infections comme par exemple celles par le virus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) où il a été montré que l'adénosine joue un rôle important dans la progression de la maladie. En effet, le récepteur A_{2A}R est fortement surexprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ des patients infectés par le virus HIV parallèlement à une forte expression de l'ecto-nucléotidase CD39 sur la population de lymphocytes Trég CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CD127^{low} [80]. La molécule CD39 participe chez ces patients à la suppression des activités effectrices des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques du fait de sa capacité à produire de l'adénosine à partir de l'ATP extracellulaire. Cette étude a également montré que l'effet inhibiteur des lymphocytes Trég pouvait être diminué grâce à des anticorps (BY40) bloquant l'activité ATPasique de CD39, ce qui permettait de rétablir

INTRODUCTION

la capacité des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques à proliférer et sécréter les cytokines pro-inflammatoires IL-2, IFN- γ et TNF- α . Le rôle immunosuppresseur du récepteur A_{2A} a été observé dans d'autres contextes inflammatoires. Ainsi, l'administration d'un agoniste sélectif du récepteur A_{2A} (ATL146e) protège le foie des souris B6, mais pas de souris déficientes pour le récepteur A_{2AR}, contre l'ischémie en réduisant la production des cytokines pro-inflammatoires [81]. De plus, les souris A_{2A}^{-/-} présentent, en réponse à l'injection d'endotoxine, une réaction inflammatoire accrue dans le foie avec un dommage tissulaire important comparée aux souris WT [82]. Cette même équipe a montré que l'activation du récepteur A_{2A} par son agoniste (CGS21680) inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires de type IL-2 et IFN- γ par les lymphocytes T ainsi que leurs fonctions cytotoxiques mais pas leur capacité proliférative, suggérant un rôle du récepteur A_{2A} dans l'inhibition des activités cytotoxiques des lymphocytes T dans un environnement tumoral riche en adénosine. Ces mêmes lymphocytes T retrouvent leurs capacités effectrices une fois isolés et cultivés *in vitro* en présence d'IL-2 [60].

Le rôle du récepteur A_{2A} dans la mort cellulaire des lymphocytes T est controversé. D'une part, le récepteur A_{2A} semble protéger les lymphocytes T contre le mécanisme de mort cellulaire induit par l'activation (AICD ou *Activation-induced-cell-death*). Ainsi, le traitement de lignées de lymphocytes T CD4⁺ humains (Jurkat) et murins (hybridomes T 7.5) par un agoniste sélectif (CGS21680) du récepteur A_{2A} diminue l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) à la membrane plasmique, l'expression du récepteur d'apoptose Fas et de son ligand en bloquant la translocation au noyau des facteurs de transcription NF- κ B et NF-AT ainsi que l'activation des caspases 3 et 8. Cette inhibition de l'apoptose pouvait être reversée par la stimulation du récepteur A_{2A} avec l'antagoniste sélectif ZM241385. L'effet anti-apoptotique du récepteur A_{2A} passe par l'activation de la PKA [83]. D'autre part, un rôle pro-apoptotique de l'A_{2AR} a été démontré dans les thymocytes murins. L'activation de ce récepteur par l'adénosine induit une mort cellulaire par l'intermédiaire de l'AMPC qui active le facteur de transcription Nur77 induisant ainsi la transcription des gènes de Fas ligand, de TRAIL (ou *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) et la protéine pro-apoptotiques Bim [84].

Les souris de la lignée 129 Sv déficientes pour le récepteur A_{2A} présentent une agressivité élevée et une hypoalgésie par rapport aux souris WT ainsi qu'une augmentation de la tension artérielle, des battements cardiaques et une plus forte agrégation plaquettaire suggérant un rôle protecteur de ce récepteur dans le système cardiovasculaire [85]. Ainsi des études cliniques sont menées pour utiliser des agonistes des récepteurs A_{2A} comme vasodilatateurs [86]. A l'inverse, les souris de la lignée de souris B6 déficientes pour le récepteur A_{2A} ont été utilisées pour démontrer des effets délétères de ce récepteur dans le cerveau. Ainsi, l'étendue de l'infarctus cérébral est réduite chez cette souris par rapport aux souris sauvages après une ischémie focale. Ainsi, Les effets anti-inflammatoires des récepteurs A₂ font également l'objet de plusieurs études cliniques dans des maladies respiratoires d'origine allergique comme l'asthme et la rhinite ou non-allergique comme la broncho-pneumopathie obstructive chronique [87].

Dans le cas du récepteur A_{2B}, des effets pro et anti-inflammatoires ont été décrits. Des souris ayant un diabète de type II présentent une expression 6 fois plus grande du

récepteur A_{2B} dans les macrophages et les cellules endothéliales de l'aorte ainsi que des taux élevés d'IL-6 secrétés par les macrophages et les adipocytes indiquant que le récepteur A_{2B} a des effets pro-inflammatoires. De plus, il a été rapporté que les souris IL-6 KO développe une obésité accompagnée de taux élevés de glucose et de lipides [88]. Chez les souris rendues déficientes pour le récepteur A_{2B} ou bien traitées par un antagoniste de ce récepteur, on observe une diminution du taux de glucose produit par le foie et une augmentation du taux d'absorption du glucose par le muscle squelettique et les tissus adipeux ainsi qu'une diminution des taux d'IL-6 [89]. Le même groupe a décrit un polymorphisme dans le gène A_{2B} associé au diabète non insulino-dépendant chez l'Homme. A l'inverse, les souris A_{2B} KO qui présentent une réponse exacerbée à la colite induite par le DSS montrent des effets protecteurs de ce récepteur dans la colite [90]. En parallèle, Hart et coll ont montré que l'activation du récepteur A_{2B} protège les souris de l'ischémie gastro-intestinale [91]. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur A_{2B} atténue l'inflammation pulmonaire chez les souris déficientes pour l'adénosine désaminase (ADA) en réduisant la fibrose et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 [92]. L'ADA étant responsable de la dégradation de l'adénosine en inosine qui est ensuite converti en hypoxanthine, la souris ADA^{-/-} meurt à l'âge de 19-25 jours d'une détresse respiratoire sévère. Cette souris est un modèle d'atteinte pulmonaire chronique, elle présente une forte activation de mastocytes et d'éosinophiles avec une accumulation de mucus et de grands taux d'adénosine dans les poumons [93] qui expriment les trois récepteurs à l'adénosine avec de grands taux de récepteurs d'A₁, A_{2B} et A₃ mais pas le récepteur A_{2A} [94, 95]. L'ADA est exprimée dans le cytoplasme et également comme ecto-enzyme à la surface des lymphocytes et des DC. Du fait de l'abondance de l'expression de l'ADA dans les tissus lymphoïdes, elle est un moyen important pour éliminer l'adénosine des sites inflammatoires et permettre ainsi de contrer l'action anti-inflammatoire de celle-ci avec pour conséquence une activation soutenue des DC et des lymphocytes T pendant l'inflammation. Ainsi la production d'une souris double *knock-out* pour les deux gènes *ada* et *a1r* génère une inflammation pulmonaire exacerbée avec une destruction alvéolaire massive. Ces souris meurent d'une détresse respiratoire à l'âge de 16 jours. Ces souris ADA et A₁ double KO présentent une surexpression des cytokines de type Th2 (ou *T helper 2*) comme l'IL-4 et l'IL-13 et des métalloprotéases matricielles MMP-9 (ou *matrix metalloproteinase-9*) et 12 qui sont respectivement impliquées dans la migration des neutrophiles et la dégradation de l'élastine alvéolaire. Ainsi il a été observé une accumulation d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes dans les poumons de ces souris KO suggérant un rôle protecteur du récepteur A₁ dans les poumons [95]. En revanche, l'utilisation des antagonistes du récepteur A₃ chez la souris ADA^{-/-} atténuent l'inflammation suggérant un rôle pro-inflammatoire du récepteur A₃ [94]. Chez l'Homme une déficience dans le gène *ada* est à l'origine d'un phénotype plus sévère que chez la souris, il se manifeste par un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) dû à une absence totale de lymphocytes T, B et NK. Cette maladie représente 20-25% du nombre total des SCID [96].

En outre, le récepteur A_{2B} inhibe l'activation des lymphocytes T par les DC. En effet, la stimulation du récepteur A_{2B} inhibe l'expression du complexe majeure d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et de la molécule de co-stimulation CD86 à la surface des DC en réponse à une stimulation par le LPS, ce qui inhibe l'expression de l'IL-

2 par les lymphocytes T [97]. En revanche, le récepteur A_{2B} joue un rôle pro-inflammatoire dans d'autres contextes. En absence de signalisation par le Toll-like receptor (TLR), l'activation du récepteur A_{2B} induit la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 qui agit avec le TGF- β pour induire la conversion des lymphocytes T naïfs CD4⁺ en lymphocytes Th17 et par conséquent générer une réponse inflammatoire chronique [98]. Ainsi, les souris A_{2B} KO présentent une réponse inflammatoire avec une production élevée de cytokines IL-6 et TNF- α en réponse au LPS [99] et une forte activation des mastocytes [100]. En revanche, il a été observé chez cette même souris une inhibition de l'inflammation pulmonaire chronique induite par un allergène avec une moindre infiltration de basophiles et d'éosinophiles dans le poumon [101]. Ceci suggère des rôles différents du récepteur A_{2B} selon le type cellulaire et le type de stimulus présent.

Quant au récepteur A₃, il est fortement exprimé sur les éosinophiles et les mastocytes. L'activation de ce récepteur induit l'apoptose dans les éosinophiles et la lignée promyélocytaire HL-60 [102]. Ainsi, la souris déficiente pour le récepteur A₃ présente un défaut de dégranulation des mastocytes ce qui protège la souris contre l'ischémie cardiaque [103]. Pourtant, une autre étude pharmacologique a montré que l'activation de ce récepteur a des effets cardioprotecteurs chez la souris WT, mais pas la souris A₃ KO [104]. Les récepteurs A₃ sont surexprimés dans la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et la maladie de Crohn. Des agonistes de ce récepteur ont été utilisés dans des études cliniques pour le traitement des patients ayant une polyarthrite rhumatoïde et qui ne répondent plus au traitement par le méthotrexate ainsi que chez des patients ayant un carcinome hépatique et une hépatite chronique [105].

3. La famille des récepteurs purinergiques P2

La famille des récepteurs P2 est divisée en deux sous-groupes, les récepteurs P2Y couplés à des protéines G et les récepteurs canaux P2X. Cette division a été initialement faite sur la base des propriétés pharmacologiques des récepteurs. Cette classification en deux familles a ensuite été refaite selon leur structure. Alors que les récepteurs métabotropiques P2Y ont une structure identique à celle des récepteurs P1, les récepteurs P2X sont des canaux cationiques trimériques.

A. Les récepteurs P2Y couplés aux protéines G

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs aux purines et aux pyrimidines couplés aux protéines G. A ce jour, huit récepteurs P2Y ont été clonés P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14. Le tableau 1 résume la sensibilité des huit récepteurs P2Y aux différents ligands ainsi que leurs principales voies de signalisation et le type de protéine G auxquelles ils sont couplés. Les récepteurs P2Y5, P2Y7, P2Y8, P2Y9 et P2Y10 ont été clonés mais sont exclus de la famille des P2YR soit parce qu'ils ne sont pas exprimés chez les mammifères ou bien ne sont pas fonctionnels en réponse aux nucléotides malgré une homologie de séquence avec les autres P2Y.

a) Expression

Les récepteurs P2Y1, 2, 4, 6 et 11 sont regroupés dans la sous-famille du récepteur P2Y1-like. Les récepteurs de cette sous-famille, du fait de leur large expression tissulaire, jouent un rôle important dans le cerveau, dans l'épithélium pulmonaire, le système gastro-intestinal, le système vasculaire et le système immunitaire [106]. Quant aux récepteurs P2Y12, 13 et 14, ils appartiennent à la sous-famille du P2Y12-like. Les récepteurs P2Y12 et P2Y13 sont exprimés en grande quantité dans, respectivement, le cerveau et la rate [107]. L'expression du récepteur P2Y14 est plus étendue : il est présent en grande quantité dans le cerveau, le placenta, les neutrophiles, les lymphocytes, les mégacaryocytes et les cellules épithéliales [108].

b) Voies de signalisation

L'activation des récepteurs P2Y induit, par l'intermédiaire des protéines Gi ou Gs, deux voies de signalisation : l'induction d'une libération calcique intracellulaire et/ou la répression ou la production d'AMPc [109,110]. Les récepteurs P2Y1, 2, 4, et 6 sont impliqués dans l'activation de la PLC et l'induction de l'IP3 et par conséquent génère une libération de calcium dans le cytoplasme à partir du réticulum endoplasmique. Au contraire, l'activation des récepteurs P2Y12, 13 et 14 inhibe l'adénylate cyclase ce qui bloque la production d'AMPc (*cf.* **Figure 2**). Les récepteurs P2Y1 et 6 présentent une activité duelle d'induction de calcium et d'inhibition de la production d'AMPc. La suramine, utilisée dans le traitement du trypanosome, est l'antagoniste commun aux deux sous-familles P2Y et P2X. Le tableau 1 résume la sensibilité des huit récepteurs P2Y aux différents ligands ainsi que leurs principales voies de signalisation (*cf.* **Tableau 1**).

Tableau 1 : La famille de récepteurs P2Y et leurs ligands [106 ,111]

Sous-famille	Récepteurs	Agoniste	G-protéine	Voies de signalisation
P2Y1-like	P2Y1	ATP/ADP	G α_q	↑ PLC- β
	P2Y2	ATP/UTP	G α_q	↑ PLC- β
	P2Y4	ATP/UTP	G α_q	↑ PLC- β
	P2Y6	UDP	G α_q	↑ PLC- β
	P2Y11*	ATP	G α_q , G α_s	↑ PLC- β et AC
P2Y12-like	P2Y12	ADP	G $\alpha_{i/o}$	↓ AC
	P2Y13	ADP/ATP	G $\alpha_{i/o}$	↓ AC
	P2Y14	UDP/UDP-glucose	G $\alpha_{i/o}$	↓ AC

↓: inhibe, ↑: active, AC: adényl cyclase, PLC: phospholipase C

*Le récepteur P2Y11 n'est pas exprimé chez la souris

c) Physiopathologies des récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y ont été décrits comme étant impliqués dans la sécrétion des cytokines et par voie de conséquence dans le développement des maladies inflammatoires [112]. Il a été montré qu'en plus des récepteurs de la sous-famille P2X, les ARNm des récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, P2Y13 et P2Y14, sont exprimés dans les poumons d'un modèle de souris asthmatiques. Ainsi, les éosinophiles, acteurs majeurs de l'asthme,

INTRODUCTION

expriment plusieurs types de récepteurs P2Y qui sont impliqués dans son activation [113]. En parallèle, l'ATP extracellulaire s'accumule dans les poumons de patients asthmatiques et est à l'origine d'une réponse immunitaire de type Th2 par l'intermédiaire des DC [114].

Il a été rapporté que le récepteur P2Y2 induit la sécrétion d'IL-6 par un mécanisme impliquant la libération calcique intracellulaire et une activation de la p38 MAPK et de la PLC dans les cellules épithéliales bronchiales humaines [115]. Ainsi, un agoniste du P2Y2R, le Denufosol, a été utilisé dans une étude clinique chez des patients atteints de mucoviscidose mais a ensuite été abandonné à cause de sa courte durée de vie par rapport à ce qui avait été observé dans les études *in vitro* [116]. D'autre part, l'activation du récepteur P2Y2 par l'UTP et l'ATP induit la sécrétion de mucus, d'eau et de chlorure de sodium au niveau de l'épithélium bronchique. C'est pourquoi un agoniste de ce récepteur, le Diquafosol, est utilisé au Japon dans le traitement du syndrome de l'œil sec [117]. En outre, les souris P2Y2 KO présentent des taux de survie inférieures avec des tensions artérielles supérieures à ceux des souris WT après néphrectomie montrant que ce récepteur joue un rôle important dans les maladies rénales chroniques [118].

L'activation du récepteur P2Y6 induit une migration vers les tissus inflammatoires de cellules de l'immunité innée comme les monocytes, les macrophages ainsi que les DC [108]. Ainsi dans une étude récente, il a été montré qu'un taux élevé d'ARNm du récepteur P2Y6 est détecté dans les macrophages murins en comparaison avec les autres récepteurs P2Y et que l'activation du récepteur P2Y6 par l'ADP induit un recrutement des macrophages par l'intermédiaire de la sécrétion du chimio-attractant MCP-1 (ou *Monocyte Chemoattractant protein 1*). De plus, dans un modèle de souris présentant une péritonite, une injection par voie intra-péritonéale d'UDP conduit à une élimination efficace des bactéries *Escherichia Coli* responsables de la maladie et donc une amélioration du taux de survie [119]. D'autre part, la transfection de cellules épithéliales humaines de poumons par des oligonucléotides antisens dirigés contre les ARNm codant le récepteur P2Y6 inhibe la sécrétion des peptides antimicrobiens par les neutrophiles humaines par un mécanisme impliquant l'IL-8 [120]. Dans le système nerveux central, la microglie joue un rôle important dans la neuro-inflammation et la phagocytose par l'intermédiaire des récepteurs P2Y4, P2Y6 et P2Y12 [121]. De même, le récepteur P2Y14 a été décrit comme impliqué dans la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales du poumon par un mécanisme impliquant le calcium intracellulaire [122].

Suite à l'activation par l'ATP, le récepteur P2Y11R induit la production d'AMPc et par voie de conséquence l'inhibition de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que la production de cytokines de type Th1 et Th2 [123]. D'autre part, il a été rapporté qu'un polymorphisme G-459-A dans le récepteur P2Y11 est corrélé à un risque élevé d'infarctus du myocarde et cela semble être lié à une inflammation exacerbée [124].

Les récepteurs P2Y semblent aussi être impliqués dans la thrombose. Il a été montré que l'ADP généré par les érythrocytes induit l'agrégation plaquettaire et cela bien avant que les récepteurs P2Y soit découverts [125]. L'ADP active les récepteurs P2Y1 et P2Y12 exprimés à la surface des plaquettes. Cela engendre un changement de la forme des plaquettes et l'exposition à la surface cellulaire de la PS, qui se fixe sur des sites spécifiques de la thrombine générant ainsi des changements allostériques et la formation et

INTRODUCTION

l'activation du complexe prothrombinase ce qui produit la thrombine et par voie de conséquence la coagulation [126]. L'antiagrégant plaquettaire, le Clopidogrel (commercialisé sous la marque Plavix), est un antagoniste irréversible du récepteur P2Y₁₂ qui a été largement utilisé contre le syndrome coronarien aigu et dans la protection contre l'infarctus du myocarde. Des inhibiteurs de récepteurs à l'ADP ont été développés dans la perspective du traitement des résistances à l'aspirine. Le médicament Clopidogrel a même réussi les essais cliniques de phase III [127]. D'autre part, les souris déficientes pour le récepteur P2Y₁₂ traitées par le LPS présentent des taux de cytokines pro-inflammatoires élevés et une plus forte infiltration par des neutrophiles par rapport aux souris WT ayant subi le même traitement [128].

La signalisation purinergique a également été étudiée dans le diabète. Il est admis depuis longtemps que les vésicules de sécrétion de l'insuline contiennent de fortes quantités d'ADP (3 à 5 mM). D'autre part, il a été montré, en utilisant un biosenseur, que les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sécrètent de l'ATP (25 μ M) en réponse au glucose [129]. Un rôle de l'ADP dans la sécrétion de l'insuline, par l'intermédiaire des récepteurs P2Y_R, a également été décrit dans les îlots pancréatiques humains [130]. En revanche, il a été rapporté que l'ADP peut aussi inhiber cette sécrétion. La raison d'une telle divergence concernant le rôle de l'ADP dans la régulation de la sécrétion de l'insuline pourrait être l'implication de différents récepteurs purinergiques. En effet, la stimulation du P2Y_{1R} par l'ADP induirait la sécrétion de l'insuline alors qu'elle serait inhibée par la stimulation du récepteur P2Y₁₃ [126]. D'autre part, l'ADP stimule l'apoptose des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas par l'intermédiaire du récepteur P2Y₁₃. Ainsi, un antagoniste du récepteur P2Y₁₃ pourrait constituer une cible thérapeutique dans le diabète [131].

B. Les récepteurs ionotropiques P2X

Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropiques. Ils ont été clonés dans plusieurs espèces d'eucaryotes. Sept récepteurs P2X, ayant comme ligand l'ATP extracellulaire ou ses dérivés (*cf.* **Figure 3**), ont été identifiés. Avec des concentrations de l'ordre de 3-10 mM, l'ATP intracellulaire joue un rôle central dans des processus comme le transport, la mobilité cellulaire et la biosynthèse. L'ATP peut être libéré dans le milieu extracellulaire (concentrations plasmatiques 400-700 nM) [132]) suite à un dommage cellulaire (nécrose, ischémie, inflammation..), à l'activation cellulaire, au transport à travers des héli-canaux, à des contraintes mécaniques ou bien par des vésicules sécrétoires [133]. L'ATP extracellulaire est ensuite dégradée, comme déjà mentionné au début de l'introduction, par les ecto-enzymes membranaires.

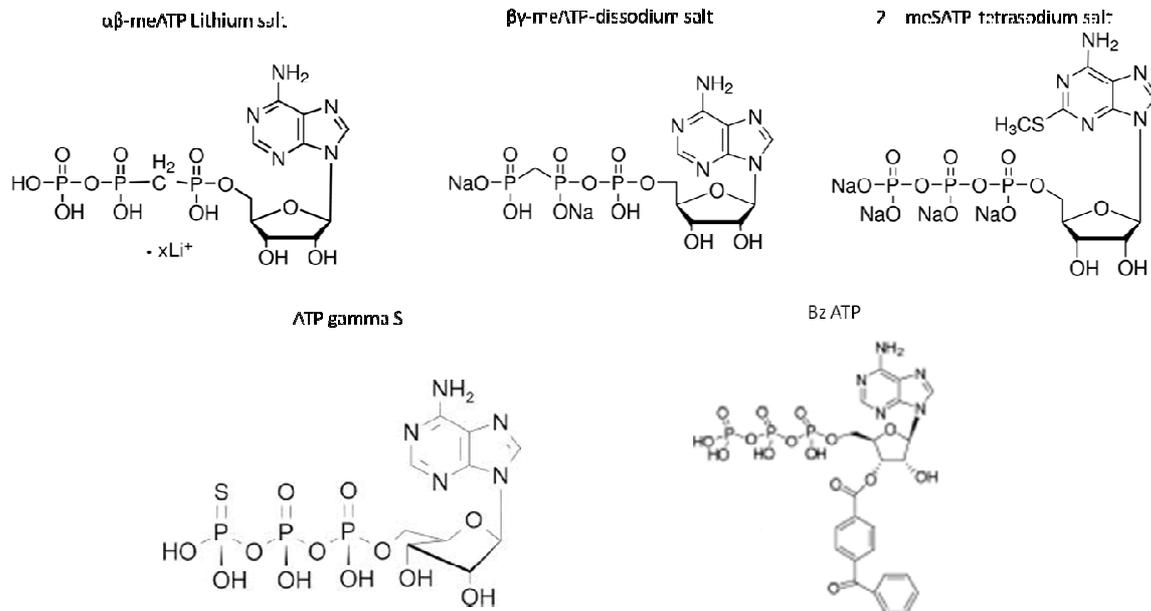


Figure 3 : Structure des principaux analogues de l'ATP
Modifié d'après Donnelly-Roberts et al. 2007 [134]

a) Structure des récepteurs ionotropiques P2X

Le premier cDNA du récepteur P2X a été cloné par deux groupes différents en 1994 : Valera et coll l'ont fabriqué à partir d'ARNm extraits du muscle lisse de canal déférent de rat [135] alors que Brake et coll l'ont isolé à partir d'une tumeur de la surrénale de rat, la lignée PC12 de phéochromocytome [136]. Le nombre d'exons et d'acides aminés formant les récepteurs P2X varient, respectivement, de 11 à 13 et de 379 (cas du récepteur P2X6) à 595 (cas du récepteur P2X7 ayant une longue partie C terminale). Différemment des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, P1 et P2Y, les récepteurs P2X sont des canaux cationiques membranaires perméables aux ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ après activation par l'ATP [137]. Les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X7 peuvent également former un pore lors d'une activation prolongée par l'ATP.

La détermination de la structure 3D du récepteur P2X4 chez le poisson zèbre d'abord dans sa position fermée ou non activée [138, Gonzales, 2009 #975, 139] puis dans son état activé par l'ATP [140] (cf. **Figure 4**) a permis de mieux préciser la structure générale des récepteurs P2X. Ces études ont confirmé que les récepteurs P2X sont trimériques et que chaque sous-unité (ou monomère) du récepteur P2X4 est constitué de deux segments transmembranaires hydrophobes (TM1 et TM2) formés chacun de 6 hélices α et qui sont liés entre eux par un long domaine extracellulaire hydrophobe riche en cystéines avec trois sites de glycosylation. La boucle extracellulaire contient une poche qui sert de site de fixation pour l'ATP, les antagonistes et les ions métalliques. Le domaine intracellulaire est composé des deux extrémités COOH et NH₂ terminales. Les sites consensus de N-glycosylation (3 à 6) présents au niveau de la boucle extracellulaire de tous les récepteurs P2X, sont nécessaires pour une fonctionnalité complète du récepteur. En effet, il a été montré qu'après inactivation de l'un des trois sites de glycosylation du récepteur P2X2, par une mutagenèse dirigée ou par la tunicamycine, l'intensité du courant ionique est faible en

réponse à l'ATP par rapport au contrôle. De plus, l'inactivation de ces sites conduit au non adressage du récepteur à la membrane plasmique et à sa rétention dans le compartiment intracellulaire [141].

Les études cristallographiques ont révélé que chaque monomère de P2X4 a la forme d'un dauphin. La queue du dauphin est constituée par les hélices α des deux domaines transmembranaires TM1 et TM2. La partie centrale de la boucle extracellulaire constitue le corps du dauphin. Elle est organisée en un sandwich de deux feuillets β riches en ponts disulfures qui assurent sa rigidité (cf. **Figure 4**). C'est la région la plus conservée des récepteurs P2X. La boucle extracellulaire possède également des parties plus flexibles qui constituent la tête et les nageoires droite, gauche et dorsale du dauphin (cf. **Figure 4A** et **4B**). Le site de fixation de l'ATP est situé entre la tête et la nageoire gauche de chaque dauphin. La nageoire dorsale d'une sous-unité voisine participe aussi à la fixation du ligand formant ainsi une poche riche en résidus chargés positivement favorisant la fixation de l'ATP dans sa forme tétra-anionique, ATP^{4-} . La superposition d'un monomère en absence (au repos) ou en présence d'ATP (état d'activation) montre des différences conformationnelles au niveau du site de liaison à l'ATP et dans les domaines TM [140] (cf. **Figure 4**). L'extrémité N-terminale du récepteur est hautement conservée entre les récepteurs P2X et contient une séquence consensus de phosphorylation par la PKC. Cette phosphorylation augmente l'activité canal du récepteur en réduisant sa vitesse de désensibilisation [142]. Quant à l'extrémité C-terminale du récepteur, sa longueur varie entre les différents récepteurs P2X mais présente un motif conservé impliqué dans le trafic du récepteur.

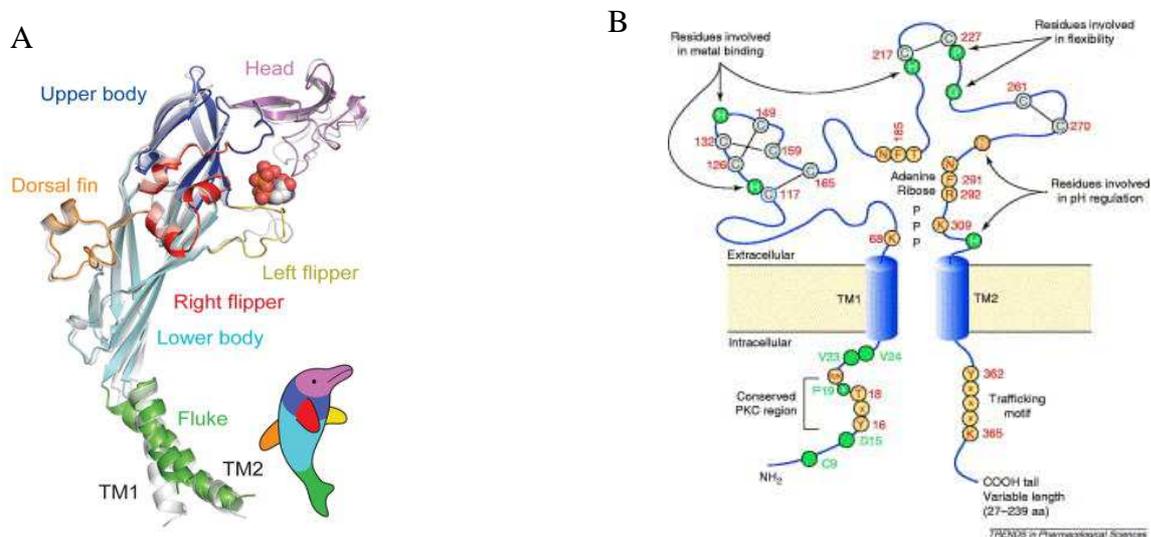


Figure 4 : Structure cristallographique et organisation des récepteurs P2X4 et P2X1.

A. Structure cristallographique du récepteur P2X4 du poisson zèbre. Cette représentation est une superposition du monomère en présence (en couleur) et en absence (en gris) d'ATP. Chacun des trois monomères du récepteur canal P2X4 présente une structure en forme de dauphin. A chaque domaine du récepteur correspond une partie du corps du dauphin [140]. **B.** Organisation du récepteur P2X1 humain. Les acides aminés marqués en rouge sont conservés entre les récepteurs P2X. En vert et orange sont représentés les acides aminés qui ont été ciblés par mutagenèse dirigée dans les récepteurs P2X2 et P2X4 [142].

La multimérisation du récepteur est nécessaire à sa fonctionnalité. Tous les récepteurs P2X, à l'exception du récepteur P2X6, peuvent former des homo ou des hétéromultimères dans les modèles d'expression hétérologue (ovocytes de xénopes ou

cellules HEK-293) [143]. En revanche, il a été longtemps considéré que le récepteur P2X7 ne peut former que des homodimères, cela sera discuté dans la section 4E. Bien que certaines études ont considéré que l'unité fonctionnelle était un hexamère formé par l'agrégation de deux trimères, notamment pour les récepteurs P2X1 et P2X3 [144], l'étude cristallographique a confirmé que l'unité fonctionnelle du récepteur P2X4 est trimérique [138].

b) Signalisation et expression des récepteurs P2X

L'activation des récepteurs-canaux P2X par l'ATP sous sa forme tétra-anionique, ATP^{4-} ($\text{EC}_{50} = 0,7 \mu\text{M}$ à $115 \mu\text{M}$), induit un influx d'ions Ca^{2+} et Na^+ et un efflux d'ions K^+ responsables d'une dépolarisation membranaire et de l'activation subséquente de canaux calciques dépendants du voltage accentuant alors l'influx de Ca^{2+} [145]. Induite de façon rapide et indépendamment de la production des seconds messagers, cette augmentation du calcium intracellulaire est importante dans le transfert de l'influx nerveux des neurones et la contraction musculaire [55]. Les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} , présents dans le milieu extracellulaire, peuvent inhiber l'activation des récepteurs P2X, probablement en diminuant l'affinité à l' ATP^{4-} pour son site de fixation en formant des complexes Mg ATP^{2-} et Ca ATP^{2-} [146, 147]. En revanche, le Zn^{2+} , un cation présent en grande quantité dans le système nerveux central, favorise l'activation du canal cationique par l' ATP^{4-} et cela pour tous les récepteurs P2X [148] excepté le récepteur P2X7 [149]. D'autre part, le changement du pH peut moduler l'affinité de ces récepteurs à l'ATP notamment l'acidité qui active le récepteur P2X2 [150], ce phénomène aurait lieu dans des contextes inflammatoires où le pH du milieu extracellulaire est fortement perturbé.

L'activation du canal est définie par la transition du récepteur d'un état fermé à un état ouvert alors que la désensibilisation ou la désactivation est la transition d'un état ouvert à un état fermé de façon irréversible. Quant à la désactivation, c'est le passage d'un état ouvert à un état fermé mais réversible [151]. Les récepteurs P2X sont divisés en deux groupes selon la rapidité avec laquelle ils se désensibilisent en présence d'ATP. Ainsi, les récepteurs P2X1 et P2X3 présentent une vitesse de désensibilisation rapide de l'ordre de 100 à 300 ms alors que les récepteurs P2X2, P2X4, P2X5 et P2X6 ainsi que l'hétéromère P2X2/P2X3 se désensibilisent plus lentement (100 à 1000 fois moins vite). Le récepteur P2X7 quant à lui est peu voire pas désensibilisé [55]. Le mécanisme de désensibilisation n'est pas encore complètement compris mais semble impliquer les domaines hydrophobes du récepteur [152] (cf. **Tableau 2**).

Les récepteurs P2X sont largement distribués sur différents tissus à l'exception du récepteur P2X3 principalement exprimé par les neurones des ganglions sensoriels [153], du récepteur P2X1 qui est principalement présent sur les cellules du muscle lisse [135] et du récepteur P2X4 qui est le seul récepteur P2X exprimé sur les cellules acinaires et les glandes salivaires [154]. Bien que les souris rendues génétiquement déficientes pour certains récepteurs P2X présentent une viabilité et un développement normal, les phénotypes anormaux qu'elles développent suggèrent qu'il n'existe pas de phénomène de compensation fonctionnelle entre les différents récepteurs P2X.

Tableau 2 : Expression tissulaire et sensibilité à l'ATP des récepteurs P2X [55, 155]

	ATP (EC ₅₀)	Désensibilisation	Principale distribution
P2X1	1 µM	Rapide	Muscle lisse, plaquettes, cervelet et neurones de la moelle épinière
P2X2	1-30 µM	Lente	Muscle lisse, SNC, rétine, pancréas
P2X3	1 µM	Rapide	Neurones sensorielles, neurones sympathique
P2X4	10 µM	Lente	SNC, testicules, colon, cellules endothéliales et microglie
P2X5	10 µM	Lente	Peau, intestin, vessie, thymus, moelle épinière, cœur
P2X6	12 µM	Lente	SNC, neurones motrices
P2X7	100 µM	Très lente voire absente	Cellules immunitaires, pancréas, peau et microglies

c) Physiopathologie des récepteurs P2X

Du fait de leur grande expression tissulaire, les récepteurs P2X sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et constituent des acteurs potentiels pour le développement de nombreuses maladies.

i. Le récepteur P2X1

Le récepteur P2X1 a été isolé initialement dans l'oocyte de Xénope [135] puis au niveau de la vessie murine et humaine [156]. Le récepteur P2X1 joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire puisque la souris P2X1 KO présente des taux réduits de formation de thrombus et des temps de saignement augmentés [157]. L'activation du récepteur P2X1 des cellules du muscle lisse du canal déférent est impliqué dans la contraction musculaire et par conséquent dans la propulsion du sperme dans l'éjaculat [158]. Ainsi, les souris mâles P2X1 KO, mais pas les hétérozygotes, sont stériles car la contraction des vésicules séminales est insuffisante pour faire passer le sperme dans le liquide séminal. D'autre part, il a été rapporté que le récepteur P2X1 est également impliqué dans le chimiotactisme et la motilité des neutrophiles dépendant de la chimiokine IL-8 et des peptides formylés en activant la voie Rho kinase responsable de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et de la modulation de son activité contractile [159]. Une isoforme du récepteur P2X1 présentant une délétion de l'exon 6, suite à un épissage alternatif, a été décrite dans des lignées de plaquettes et de mégacaryocytes. Elle présente une sensibilité plus forte à l'ADP qu'à l'ATP [160]. D'autre part le récepteur P2X1 peut former des hétérodimères avec les récepteurs P2X2, P2X3, P2X4 et P2X5 [161,162,163]. Dans un modèle de colopathie fonctionnelle (aussi appelée troubles fonctionnels intestinaux) induite chez le rat par l'administration d'acide acétique dans le colon, différents groupes ont mis en évidence le rôle des récepteurs P2X1, P2X3 et de l'hétérodimère P2X1/P2X3 dans le développement de la maladie. En effet, la distension du colon s'accompagnait d'une douleur viscérale causée par une sécrétion d'ATP par les cellules épithéliales. Une surexpression des récepteurs P2X3 sur les neurones du ganglion spinal dorsal était aussi observée. De plus, ces auteurs ont montré que l'administration d'un antagoniste des récepteurs P2X1, P2X3 et P2X2/P2X3, le TNP

[2',3',-O-(2,4,6-trinitrophényle)]-ATP, permettait de traiter l'hypersensibilité viscérale causée par l'ATP [164].

ii. Le récepteur P2X2

Le récepteur P2X2 a été initialement cloné à partir de la lignée PC12 de phéochromocytome de rat et d'hypophyse humaine [137]. Il existe plusieurs isoformes du récepteur P2X2 générées par épissage alternatif dans différentes espèces notamment chez la souris et l'Homme. Ainsi, l'isoforme P2X2b possède une partie C-terminale plus courte présente une activité canal plus rapide que la forme classique. Bien que l'affinité de l'isoforme P2X2b ne soit changée pour les agonistes, elle est moins sensible aux antagonistes [165].

Il a été rapporté que le récepteur P2X2 est impliqué dans la perte de l'audition liée à l'âge et à l'exposition au bruit chez l'Homme et la souris. Le récepteur P2X2 est exprimé par les cellules épithéliales de la partition cochléaire, les cellules ciliées, les cellules de l'organe de Corti ainsi que le ganglion spiral afférent. Dans l'organe de Corti, l'exposition à un bruit continu induit une surexpression du récepteur P2X2 probablement suite à une sécrétion d'ATP dans la partition cochléaire. L'activation du récepteur P2X2 par l'ATP induit l'activation du canal cationique et une diminution de la transduction du son par les cellules ciliées de l'oreille. D'autre part, les souris déficientes pour le récepteur P2X2 développent une presbycusie. Il s'agit d'une perte progressive liée à l'âge de l'audition induite par l'exposition au bruit (20-36 Khertz) [166]. Le phénomène de perte d'audition chez la souris est un modèle représentatif de la mutation perte de fonction du récepteur P2X2 décrite chez l'Homme qui est corrélée à une perte héréditaire progressive de l'audition. En absence de ce récepteur, la cochlée est plus susceptible à la perte de l'audition dépendante de l'âge ou bien à l'exposition au bruit. Ce qui suggère un mécanisme de régulation du son dans la partition cochléaire dépendante du récepteur P2X2.

iii. Le récepteur P2X3

Isolé initialement à partir du ganglion spinal de rat [167], l'expression du récepteur P2X3 murin est restreinte aux neurones [137]. Le récepteur P2X3 humain est exprimé dans la moelle épinière et le cœur [168]. Une structure hétérotrimère P2X2/P2X3 a été décrite par des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* infectées par deux baculovirus codant pour les récepteurs P2X2 et P2X3 [169]. L'hétérodimère P2X2/P2X3 présente des propriétés pharmacologiques inverses à celles des récepteurs P2X2 ou P2X3, comme la résistance à l'activation par l'acide phosphorique α , β , Méthylène-ATP ($\alpha\beta$ -meATP) ainsi qu'une faible désensibilisation par l'ATP [169]. Il a été montré que les souris déficientes à la fois pour ces deux récepteurs meurent d'une infection pulmonaire aiguë. D'autre part, Coutinho-Silva et coll ont rapporté que ces souris présentent une splénomégalie due à une accumulation de lymphocytes T et B et de macrophages probablement due à une infection chronique [170]. La souris déficiente pour le récepteur P2X3 a été utilisée dans le contexte de dysfonctionnement de la miction. Des études ont montré que les vessies de ces souris sont hyperactives et que le récepteur P2X3 induit une augmentation de la miction et de la

capacité de la vessie [171]. Ainsi des études cliniques ciblant ce récepteur ont été entreprises dans le traitement de l'hyperactivité urinaire notamment avec le composé pharmaceutique RO3 (Roche) et la toxine botulique qui agissent en réduisant la sécrétion d'acétylcholine et d'ATP par des neurones parasympathiques des cellules urétrales [172].

iv. Le récepteur P2X4

Le récepteur P2X4 a été isolé simultanément d'un ganglion lymphatique cervical [173], du cerveau et plus particulièrement de l'hippocampe [174] ainsi que de cellules pancréatiques [175]. Le récepteur P2X4 est stocké dans des lysosomes et n'est exprimé à la membrane plasmique qu'en réponse à des signaux extracellulaires, il est hautement glycosylé ce qui lui confère une résistance à la dégradation lysosomale. Par exemple, une stimulation de la microglie par le LPS cause une stabilisation du récepteur à la surface membranaire pendant au moins 3h. Les récepteurs P2X4 contenus dans les lysosomes conservent leur fonctionnalité et peuvent être surexprimés à la surface membranaire après une exocytose des lysosomes. L'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose montre que le récepteur P2X4 a la particularité d'être constitutivement internalisé par un mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines. De plus, il a été montré que le récepteur P2X4 présente une mobilité latérale à la surface membranaire des cellules de la microglie activées par le LPS et ce phénomène semble être dépendant de l'activation par l'ATP et par conséquent de l'influx calcique [176].

Le récepteur P2X4 est aussi abondamment exprimé dans l'endothélium et joue un rôle dans l'activation de l'influx calcique de ses cellules et par conséquent dans la vasodilatation. Une surexpression des ARNm codant pour le récepteur P2X4 a été retrouvée lors de l'insuffisance cardiaque chez le rat et l'Homme et il semble que cela joue un rôle bénéfique dans l'amélioration du taux de survie [177]. Ainsi, les souris déficientes pour le récepteur P2X4 présentent une augmentation de leur tension artérielle due à une réduction de l'influx calcique dans leurs cellules endothéliales et par conséquent une production plus faible dans la circulation sanguine d'oxyde nitrique (NO), un puissant vasodilatateur [178].

Des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence que des homotrimères du récepteur P2X4 s'assemblent avec ceux du récepteur P2X7 dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse. De même, une mutation non fonctionnelle dans le récepteur P2X4 présente un effet inhibiteur sur le courant induit par le récepteur P2X7, alors qu'une autre mutation sur le récepteur P2X4 présente un courant avec des caractéristiques du récepteur P2X4 notamment la sensibilité au médicament anti-parasitaire ivermectine et l'inhibition par le TNP-ATP [179].

Plus récemment, des groupes s'intéressant aux rôles de la signalisation purinergique dans le foie et son implication dans la régénération hépatique ont montré qu'une hépatectomie partielle du foie induit une sécrétion d'ATP forte dans le sang et cela contribue à la prolifération des hépatocytes. Notre laboratoire a récemment montré que les récepteurs P2X4 et P2X7 sont exprimés dans les hépatocytes, les cholangiocytes et les cellules de Kupffer. De plus, les souris déficientes pour le récepteur P2X4, contrairement aux souris sauvages, présentent une régénération retardée, une nécrose, une cholestase, une

sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une modification de la nature de la bile suggérant que le récepteur P2X4 est impliqué dans la prolifération des hépatocytes par un mécanisme impliquant la réponse inflammatoire et l'homéostasie biliaire dans le foie (Besnard, A et al. manuscrit en préparation).

Une isoforme du récepteur P2X4 (P2X4a) tronquée au niveau de l'exon 6 codant pour le domaine extracellulaire a été isolée chez la souris. Cette isoforme générée par épissage alternatif présente des courants de membrane plus rapides et une affinité plus forte à l'ATP. Cette isoforme ne peut pas former d'homodimères mais peut s'associer avec la version complète du récepteur P2X4 pour former un canal fonctionnel moins affiné pour l'ATP [180].

v. Le récepteur P2X5

Caractérisé à partir d'une banque d'ADNc de ganglion coélicaque et de cœur de rat [137], le récepteur P2X5 est largement exprimé sur les cellules endothéliales de la peau et de l'intestin, les cellules épithéliales de la vessie et de l'urètre, les neutrophiles, les éosinophiles et les DC, le muscle lisse de l'intestin et la moelle épinière [180]. Il est connu pour sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire et à induire la différenciation cellulaire comme par exemple dans les cellules souches musculaires appelées cellules satellites. Lors d'une lésion des fibres musculaires squelettiques, les cellules satellites prolifèrent et une partie d'entre elles se différencient en cellules musculaires afin de réparer le tissu lésé. L'activation du récepteur P2X5 inhibe leur prolifération et induit leur différenciation [181]. Ainsi Calvert et coll ont montré que la lignée cellulaire humaine PC-3 issue d'un cancer de la prostate exprime les récepteurs P2X3, 4, 5 7 et le P2Y2 à la surface membranaire et que l'ATP a un rôle antinéoplasique. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques des récepteurs P2X3, P2X4, et P2Y2 n'ont aucun effet sur la prolifération cellulaire suggérant que l'effet de l'ATP est médié par les récepteurs P2X5 et P2X7 et probablement P2Y11 [182,183]. D'autres études ont montré que le récepteur P2X5 murin est peu fonctionnel et qu'il peut s'associer avec d'autres récepteurs, P2X1, P2X2 ou encore P2X4 [184,185]. Ainsi, l'hétérodimère P2X5/P2X1 génère une plus forte sensibilité à l'ATP et à son dérivé α , β , Me-ATP, un phénomène qui n'est pas observé lorsque ces deux récepteurs sont exprimés sous forme d'homotrimères [186]. Récemment il a été montré que les récepteurs P2X5 et P2X2 s'associent pour former un hétérodimère ayant les propriétés du récepteur P2X7. En effet, l'hétérodimère P2X2/P2X5 présente les mêmes cinétiques de perméabilité au NMDG (ou N-méthyl-D-glucamine) ou à des molécules fluorescentes (YO-PRO-1 ou éthidium) que le récepteur P2X7. D'autres part, l'hétérodimère P2X2/P2X5 est, comme le récepteur P2X7, capable d'induire l'externalisation réversible de la PS [185]. Une isoforme tronquée au niveau de l'exon 10 suite à un épissage alternatif du récepteur P2X5 a été décrite chez l'Homme [187].

vi. Le récepteur P2X6

Le récepteur P2X6 a été cloné à partir d'un ganglion lymphatique cervical et de cerveau de rat alors que son homologue humain a été cloné à partir des lymphocytes périphériques. Lorsqu'il est exprimé sous forme d'homodimère, le récepteur P2X6 semble être une forme silencieuse dans le sens où il n'induit aucun courant ionique. Il diffère des

autres récepteurs P2X par le fait qu'il est fonctionnel uniquement lorsqu'il est exprimé en hétéromultimère [188]. Ainsi, des structures hétérodimériques formées de P2X2/P2X6 et P2X4/P2X6 ont été décrites dans des systèmes hétérologues. L'hétérodimère P2X2/P2X6 présente des propriétés différentes des autres homodimères décrits notamment en condition de variation du pH extracellulaire [189]. Quant à l'hétérodimère P2X6/P2X4 trouvé dans le cerveau du rat et la moelle épinière, il présente des propriétés pharmacologiques différentes du récepteur P2X4 notamment une sensibilité plus forte à une stimulation par le α , β , me-ATP et, contrairement au récepteur P2X4, il est inhibé par la suramine [190]. Plus récemment, il a été montré que les récepteurs P2X2, P2X4 et P2X6 peuvent s'associer en hétéromères dans les cellules de Leydig de souris mais le rôle physiologique de cette association est encore inconnu [191].

D'autre part, il a été rapporté l'existence dans le muscle squelettique d'un récepteur appelé P2XM codé par un gène qui partage une forte homologie de séquence d'acides aminés (93%) avec le récepteur P2X6. Ce récepteur P2XM peut être régulé par le facteur de transcription p53. Alors que chez le rat le récepteur P2X6 est largement exprimé dans le système nerveux central et les tissus périphériques, l'expression du récepteur P2XM est restreinte au muscle squelettique [137].

Il a été montré qu'une surexpression du récepteur P2X6 est détectée dans le myocarde de patients ayant une insuffisance cardiaque accompagnée d'une augmentation du TNF- α [192,193]. Cette même étude a montré que l'activation des fibroblastes primaires de cochons et des cardiomyocytes de souris par l'ATP induit une apoptose par l'intermédiaire du récepteur P2X6 et cela passe probablement par un influx massif de calcium.

vii. Le récepteur P2X7

Les caractéristiques et fonctions du récepteur P2X7 sont détaillées dans la section 3 qui lui sera entièrement consacrée.

4. Le récepteur P2X7

Le récepteur P2X7 est exprimé d'une façon prédominante, mais pas exclusive, sur les cellules immunitaires. Les activités de ce récepteur ont été initialement décrites en 1980, dans des mastocytes où son activation induisait une sécrétion de l'histamine et une activation du métabolisme du phosphatidyl-inositol [194]. Possédant des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles différentes des autres récepteurs P2X et P2Y, il a été initialement considéré différent et par conséquent appelé « P2Z » [195].

A. Structure et propriétés pharmacologiques du P2X7R

Les premiers ADNc du récepteur P2X7 humain et murin ont été clonés à partir, respectivement, de monocytes [196] et de microglies [197]. A ce jour, les ADNc du récepteur P2X7 ont été clonés chez six mammifères (Homme, macaque, chien, rat, souris

INTRODUCTION

et cochon d'inde) et deux espèces non-mammifères (xénope et poisson zèbre) [198]. Le récepteur P2X7 se distingue des autres récepteurs P2X par sa faible affinité à l'ATP puisque les concentrations requises pour son activation dépassent 100 μM . D'autre part et contrairement aux autres récepteurs P2X, le 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP (BzATP) est 10 à 30 fois plus efficace que l'ATP pour activer le récepteur P2X7 [195].

Sur la base de la cristallographie du récepteur P2X4 [140], la structure cristallographie du récepteur P2X7 a été récemment modélisée. Tous comme les autres P2X, chaque sous-unité du récepteur P2X7 est composée d'une large boucle extracellulaire et de deux domaines transmembranaires avec deux queues intracellulaires, une courte N-terminal et une longue C-terminale. La structure 3D générale d'une sous-unité du récepteur P2X7 montre que, comme pour le récepteur P2X4, elle ressemble à un dauphin avec le domaine extracellulaire et les deux domaines transmembranaires formant respectivement le corps et la queue du dauphin (*cf.* **Figure 4 et 5**). La structure du récepteur P2X7 présente quelques différences notamment au niveau des feuillettes $\beta 3$ et $\beta 4$ qui sont plus longs que ceux du récepteur P2X4 et l'hélice $\alpha 4$ qui est, contrairement au récepteur P2X4, absente du récepteur P2X7.

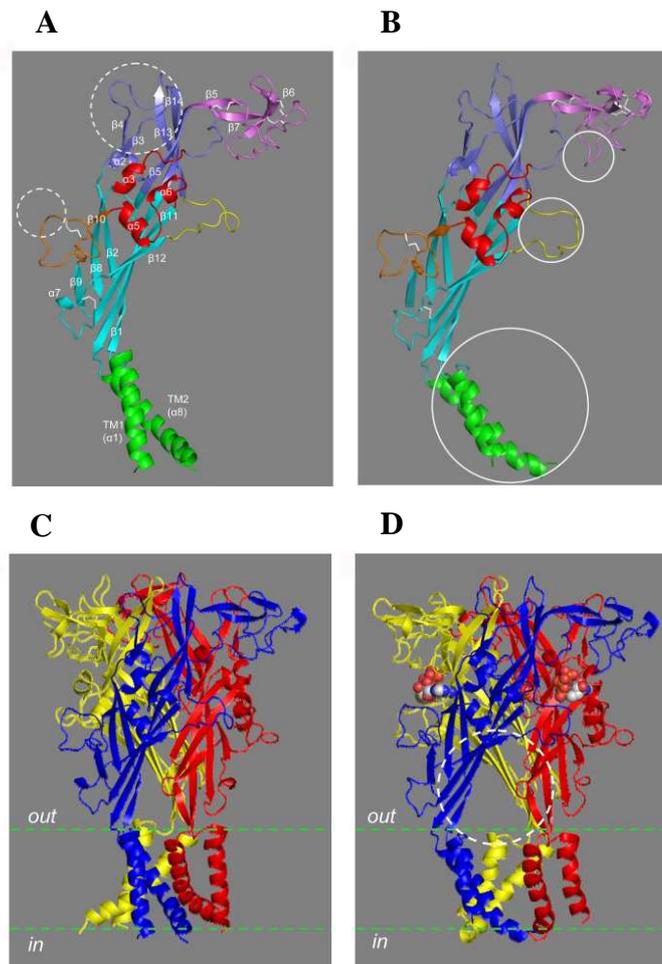


Figure 5 : Modélisation du récepteur P2X7 humain d'après la cristallographie du récepteur P2X4 du poisson zèbre.

A. Récepteur P2X7 au repos. **B.** Récepteur P2X7 activé par l'ATP. Les différents domaines sont représentés en couleur et les cinq ponts disulfures en blanc. Les cercles dans **B** montrent les principales structures communes avec le récepteur P2X4. **C.** Modélisation de l'association en trimère de trois sous-unités du récepteur P2X7 au repos. **D.** Modélisation de l'association en trimère de trois sous-unités du récepteur P2X7 activé par trois molécules d'ATP avec le cercle indiquant l'entrée des cations. Chaque couleur dans **C** et **D** indique une sous-

unité du récepteur P2X7 [198]. Il a été récemment montré que deux molécules d'ATP sont suffisantes pour l'activation du P2X7R [199].

a) Les agonistes

i. L'ATP et ses dérivés

L'ATP est le principal agoniste du récepteur P2X7. Comparé aux autres récepteurs P2X, le récepteur P2X7 nécessite des concentrations 100 fois plus fortes d'ATP pour son activation. Les dérivés de l'ATP agissent aussi comme agonistes du récepteur P2X7 tel le BzATP qui est l'activateur le plus puissant de ce récepteur avec une EC_{50} de 10 μ M. Les dérivés comme le 2-meSATP (ou 2-methylthio ATP), l'ATP γ S (ou adénosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) sont des agonistes partiels du récepteur P2X7 alors que les composés comme le $\alpha\beta$ -meATP et le $\beta\gamma$ -meATP ($\alpha\beta$ ou $\beta\gamma$ -méthylène-ATP) ont de très faibles effets sur l'activation du récepteur [195, 200]. Le dérivé 2-meSATP est un agoniste puissant des récepteurs P2X et P2Y mais pas des récepteurs à l'adénosine. L'ATP γ S présente une substitution du dernier groupement phosphate par un groupement thiol résultant d'une résistance à l'hydrolyse par les ectonucléotidases. Le $\alpha\beta$ et le $\beta\gamma$ meATP sont des analogues de l'ATP présentant une plus grande stabilité métabolique puisque le pont oxygène entre les phosphates est remplacé par un groupe méthylène (cf **Figure 3**) [200]. La sensibilité de ces agonistes diffère selon l'espèce où le récepteur P2X7 est exprimé et aussi entre les individus de la même espèce (cf **Tableau 3**). Cette différence entre individus est principalement due aux SNP (*single nucleotide polymorphisme*) et aux isoformes exprimées par épissage alternatif (cf **Figure 10**, section **4D**).

Tableau 3 : Propriétés pharmacologiques des récepteurs P2X7 de mammifères [201]

	Homologie de séquence (%)	ATP (EC_{50} en μ M)	BzATP (EC_{50} en μ M)	ATP γ S
Humain	100	96	5	>100
Macaque	96	800	58	N.D.
Chien	85	1148	21	N.D.
Rat	80	85	4	>1000
Souris BALB/c	80	200	60	>1000
Souris B6	80	162	36	>1000
Cochon d'inde	77	603	>200	N.D.

ii. Activation par ADP-ribosylation

L'activation du récepteur P2X7 murin peut aussi se faire par le NAD (ou nicotinamide adénine dinucléotide) suite à une modification post-traductionnelle ADP-ribosylation au niveau de l'arginine 125 présent dans la boucle extracellulaire du récepteur. En effet, le transfert d'un groupe ADP-ribose du NAD sur la protéine se fait par l'intermédiaire d'une ecto-enzyme membranaire appelée (mono) ADP-ribosyl-transférase ART qui bloque l'interaction de la protéine avec son ligand et généralement inhibe ses fonctions sauf dans le cas du récepteur P2X7 où elle l'active [202, 203].

INTRODUCTION

La famille des ART se compose de 4 membres chez l'Homme (1, 3, 4 et 5) et de six membres chez les murins (1, 2.1, 2.2, 3, 4 et 5). Tous les membres de la famille des ART sont ancrés par un glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) à la surface membranaire à l'exception de l'ART 5 qui est sécrétée. L'ART 2 est le membre le plus caractérisé à la surface des lymphocytes T murins et ne possède pas d'équivalent chez l'Homme. L'ADP-ribosylation par l'ART 2 active le récepteur P2X7 en mimant les actions de l'ATP et par conséquent induit les activités d'influx calcique, de formation du pore non sélectif, d'exposition de la PS, de clivage de la molécule de homing CD62L et de mort cellulaire par un mécanisme connu sous le nom de NICD (*NAD induced cell death*) [202,203,204,205]. Le mécanisme de NICD est régulé par la molécule CD38 (NAD-glycohydrolase) qui dégrade le NAD limitant ainsi l'activation de l'enzyme ART 2 [206]. Parallèlement, un autre groupe a proposé que le NAD induit deux types de mort cellulaire dans les lymphocytes T: 1) une nécrose impliquant le récepteur P2X7 induite en quelques secondes suite à l'exposition au NAD (< 10 µM) associée à une externalisation de la PS indépendante de l'activation des caspases et à la formation de pore ; 2) une apoptose indépendante du récepteur P2X7 induite en quelques heures après une exposition à de fortes doses de NAD (> 100 µM) [207]. Les concentrations en NAD requises pour activer le récepteur P2X7 sont moindres que celles en ATP. Par exemple, l'exposition de la PS à la surface des lymphocytes T est induite par des EC₅₀ de 100 µM pour l'ATP et 2 µM pour le NAD [204].

L'ART 2 comporte deux isoformes 2.1 et 2.2 (80 % d'homologie) codées respectivement par deux gènes en tandem *art2a* et *art2b*. Ces deux récepteurs sont coexprimés à la surface des lymphocytes T matures mais pas à la surface des lymphocytes immatures. L'isoforme 2.1, contrairement à l'isoforme 2.2, présente deux cystéines qui forment un pont disulfure inhibant allostériquement l'activité catalytique. Cette isoforme n'est donc fonctionnelle qu'en conditions réductrices après cassure du pont disulfure et cela peut avoir lieu dans des contextes d'inflammation et de dommages tissulaires [208,209]. L'activité ADP-ribosyl transférase observée sur les lymphocytes T est principalement dépendante de l'isoforme ART 2.2 alors que celle observée dans les macrophages de la rate, les DC, et les lymphocytes B dépendrait plutôt de l'isoforme ART 2.1. D'autre part les neutrophiles expriment l'ART 2.1 dans le compartiment intracellulaire et l'expression à la surface membranaire de cette enzyme est induite après stimulation par le peptide FMLP [210]. Contrairement à la souris, l'activation du récepteur P2X7 ne peut pas se faire chez l'Homme par l'ADP car il n'existe pas d'orthologue de l'enzyme ART(2) bien que les résidus Arg 125 et 133 soient conservés sur le récepteur P2X7 [196,211]. L'activation du récepteur P2X7 par le NAD a été décrite dans les lymphocytes T murins issus de différentes lignées de souris mais pas dans les macrophages ou les lymphocytes B [212]. Il a été rapporté qu'il existe des différences de sensibilité à l'activation du récepteur P2X7 par ART 2 en fonction du stade d'activation des lymphocytes T. Ainsi, il a été montré que les lymphocytes T périphériques naïfs sont plus sensibles que les lymphocytes T activés à la mort cellulaire induite par le NAD qui peut être inhibée par la *phosphatidylinositol-specific phospholipase C* ou bien des anticorps bloquant l'activité d'ART 2 [202,213]. La résistance des lymphocytes T activés à la mort cellulaire par le NAD est due au clivage de l'enzyme ART 2.2 au niveau de son côté C-terminal par ADAM 17. L'enzyme ART 2.2 clivée est fonctionnelle puisqu'elle ajoute le

groupement ADP-ribosyl sur plusieurs substrats [214]. Bien que les macrophages dérivés de la moelle osseuse issus de la souris BALB/c n'expriment aucun membre de la famille ART, l'expression membranaire de l'isoforme ART 2.1 est induite à la surface de ces cellules en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires notamment le LPS et les IFN de type I et II [202, 215]. De plus, le NAD semble potentialiser la réponse ATP-dépendante du récepteur P2X7 dans les macrophages de la moelle osseuse [209]. Il est important de noter que des quantités importantes d'ATP et de NAD sont contenues dans les érythrocytes ce qui permet la libération du NAD dans l'espace extracellulaire suite à la lyse des érythrocytes [205]. La lyse des érythrocytes peut survenir dans des cas pathologiques notamment chez des patients atteints d'anémie hémolytique, en cas de malaria suite à une infection par le parasite trypanosome ou encore l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. Il est donc important de bloquer cette libération de NAD lors de la préparation des cellules *ex vivo* afin de protéger les lymphocytes Trég et NKT de la mort induite par le NAD. L'utilisation d'un nano anticorps, plus petits et plus stables que des anticorps conventionnels, permet d'inhiber l'activité enzymatique de l'ART 2 et de protéger les cellules lors de leur préparation [216].

iii. Autres agonistes du récepteur P2X7

D'autres composés induisent l'activation du récepteur P2X7 mais en agissant différemment selon l'espèce. Ainsi, alors que le peptide antimicrobien humain LL-37 (ou cathelicidine) induit l'activation des récepteurs P2X7 humain et murin [217], son homologue murin CRAMP (*cathelicidin-related anti-microbial peptide*) inhibe le récepteur P2X7 murin mais active le récepteur P2X7 humain [218]. La raison de cette spécificité d'espèce du CRAMP n'est pas connue. D'autre part l'antibiotique polymyxine B induit l'activation du récepteur P2X7 humain mais pas murin contrairement au médicament anti-parasitaire ivermectine qui induit l'activation du récepteur P2X7 humain mais pas murin [219, 220]. En outre, différents lipides, notamment la lyso-phosphatidylcholine et les sphingosyl-phosphorylcholines ainsi que des anesthésiques comme la kétamine, le propofol et le thiopental sont connus pour activer les récepteurs P2X7 [201].

b) Les antagonistes du récepteur P2X7

i. Les antagonistes chimiques

Il existe un certain nombre d'antagonistes du récepteur P2X7 qui diffèrent quant à leur structure chimique, leur mode d'action, leur spécificité et leur sélectivité d'espèces. La première génération d'antagonistes décrite était non spécifique du récepteur P2X7 puisqu'elle permettait d'inhiber d'autres récepteurs P2X ou encore des récepteurs P2Y. Les premiers antagonistes du récepteur P2X7 comme le *Reactive Blue 2* datent des années 1970. Dans les années 1980, sont apparus la suramine et le BBG (ou *brilliant Blue G*) puis le PPADS (ou *pyrodoxal phosphate-6-azophenyl-2-4-disulfonic acid*), l'oATP (ou *periodate oxidized ATP*) et le KN-62 (ou *1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-l-tyrosyl]-4-phenylpiperazine*) dans les années 1990. Les structures de ces antagonistes ont ensuite subies des modifications dans le but d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques et leur spécificité comme par exemple le MR 2540 dont la structure est dérivée de celle du KN-62 mais avec une plus forte activité inhibitrice sur les récepteurs P2X7 humain et

INTRODUCTION

murin [201]. Il est important de noter que certains antagonistes présentent des caractéristiques pharmacologiques différentes selon qu'ils sont utilisés sur des récepteurs P2X7 endogènes ou pas. Par exemple, le KN-62 en concentrations nanomolaires inhibe tous les récepteurs P2X7 des mammifères, sauf celui de rat, exprimés dans la lignée HEK-293 [221]. Ainsi l'activité de ces antagonistes varie en fonction des conditions d'expérimentation (concentrations, temps d'incubation, température..). D'autre part, le BBG est considéré comme un antagoniste spécifique du récepteur P2X7 du fait de sa capacité à inhiber son activation à des concentrations nanomolaires alors qu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire le BBG est utilisé pour inhiber les autres récepteurs P2X notamment les récepteurs P2X2, P2X3, 2X2/3, P2X4 et P2X1/5 [222]. Des études plus récentes ont montré que le BBG est aussi capable de bloquer la pannexine-1, une protéine de la jonction communicante intercellulaire, ce qui rend difficile son utilisation comme antagoniste du récepteur P2X7 [223]. Concernant l'ATP, bien qu'il se lie de façon covalente au récepteur P2X7, tout comme le PPADS, il a été décrit comme pouvant inhiber d'autres récepteurs comme P2X2 et P2X3 [224].

Une deuxième génération d'antagonistes du récepteur P2X7 utilisable *in vitro* a été développée comme par exemple les composés de tétrazole/triazole, (A438079 et A839977), les adamantyl amides (AZ10606120 et le AACBA), les dérivés de cyanoguanidine (AZ40003), l'imide cyclique (AZ11645373) et les dérivés de nicotinamides (JNJ-47965567) [201].

Le **Tableau 4** présente les IC₅₀ des différents antagonistes du récepteur P2X7 utilisés chez l'Homme et dans deux lignées de souris présentant des sensibilités différentes à l'ATP, les souris BALB/c étant les plus sensibles (*cf.* **Tableau 4**).

Tableau 4 : Les différents antagonistes du récepteur P2X7 et leur IC₅₀ correspondantes [201]

IC ₅₀ (µM)	PPADS	BBG	Reactive Blue	KN-62	A438079	A740003	AZ10606120	AZ11645373
Homme	1,2	1,9	5,4	0,2	0,9	0,09	0,003	0,05
Souris B6	40	0,5	18	0,6	0,6	1,7	0,6	1,6
Souris BALB/c	4,9	0,2	21	0,2	0,6	0,7	0,6	1,6

Les premiers antagonistes du récepteur P2X7 utilisés *in vivo* dans un modèle murin d'EAE sont le BBG et l'ATP [225]. Ainsi, il a été montré que l'inhibition du récepteur P2X7 par ses antagonistes réduit la démyélinisation des axones et améliore le score de la maladie en protégeant les oligodendrocytes de la mort induite par l'ATP. D'autre part, l'inhibition du récepteur P2X7 par le BBG réduit les scores et les symptômes dans des modèles murins d'épilepsie, de gliome, d'autisme, de dépression, d'Alzheimer, de maladie d'Huntington et de Parkinson en réduisant l'inflammation induite par le récepteur P2X7 dans la microglie [226,227]. Malgré les succès rencontrés avec les antagonistes du récepteur P2X7 dans les modèles murins, les résultats étaient plus mitigés chez l'Homme et cela est dû aux variations, entre les deux espèces, des séquences en acides aminés de la boucle extracellulaire du récepteur P2X7 [228,229].

ii. Autres composés inhibant le récepteur P2X7

En plus des antagonistes décrits ci-dessus, des composés naturels ainsi que des médicaments peuvent avoir des actions inhibitrices sur le récepteur P2X7. Des médicaments comme la colchicine, qui est utilisée dans le traitement de maladies inflammatoires comme la goutte et la fièvre méditerranéenne familiale, inhibe l'activité pore du récepteur P2X7 mais pas son activité canal [230]. Comme pour les autres P2X, les cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} inhibent *in vitro* l'activation des récepteurs P2X7 en chélatant la forme acide libre de l'ATP (ATP^{4-}) responsable de l'activation du récepteur P2X7 [195,197,231]. D'autres rapports suggèrent que ces cations bivalents se comportent comme des effecteurs allostérique négatifs du récepteur [232].

B. Expression du récepteur P2X7

Il a été longtemps considéré que l'expression du récepteur P2X7 est restreinte aux cellules hématopoïétiques : macrophages, DC, monocytes, lymphocytes, érythrocytes, mastocytes, éosinophiles et ostéoclastes. Aujourd'hui, il est admis que le récepteur P2X7 est aussi présent sur d'autres types cellulaires comme les ostéoblastes, fibroblastes, cellules endothéliales et épithéliales [201], les cellules du système nerveux central et périphérique notamment la microglie, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann [233] et aussi sur des populations de neurones de la moelle épinière, du cervelet, de l'hypothalamus et de la substance noire [234]. D'autre part, la construction de la lignée de souris transgénique exprimant le gène recombinant (*p2x7-egfp*) où le gène *p2x7* est fusionné au gène rapporteur *egfp* a permis de suivre l'expression du récepteur P2X7 dans le système nerveux. Le gène *egfp* a été inséré au niveau du codon d'initiation ATG du premier exon du gène *p2x7*. En effet, les études utilisant ces souris transgéniques dans des modèles d'épilepsie ont montré que l'expression du récepteur P2X7 est induite dans le système nerveux central après des crises d'épilepsie prolongées [234,Engel, 2012 #1134,Jimenez-Pacheco, 2013 #1135]. Une autre étude utilisant ces souris transgéniques a montré que l'expression du récepteur P2X7 est corrélée avec l'expression du facteur de transcription Sp1 dans le cerveau. Ainsi, l'inhibition de Sp1 par la mithramycine A ou bien par des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA ou *short hairpin RNA*) réduit les taux du récepteur P2X7 dans les cellules primaires de neurones corticaux et d'astrocytes [235].

L'expression du récepteur P2X7 peut être modulée par des médiateurs pro-inflammatoires comme l'interferon- γ (IFN- γ), le TNF- α , et le LPS sur les macrophages, les cellules endothéliales ombilicales et les cellules épithéliales [236,237]. A l'inverse, des médiateurs anti-inflammatoires comme le TGF- β 1 inhibent l'expression du récepteur P2X7 induite par l'IFN- γ et le LPS dans la lignée monocyttaire THP-1 [238]. D'autre part, il a été montré que des composés chimiques comme le 2-[1-(6-amminopurin-9-il)-2-osso-etossi]prop-2-énale (ou MED1011) inhibe l'expression du récepteur P2X7 et par conséquent ses fonctions en causant son internalisation dans la lignée de monocytes U937 [239].

C. Activités cellulaires et physiologiques du récepteur P2X7

a) Ouverture du canal ionique

La concentration basale du calcium libre intracellulaire est de l'ordre de 100 nM alors que dans le milieu extracellulaire elle est de l'ordre de 1-2 mM. Le réticulum endoplasmique est le principal lieu de stockage du calcium (~ 1 mM) [240]. L'homéostasie du calcium dans la cellule est assurée par un ensemble de canaux de la membrane plasmique dont les CRAC (ou *Ca²⁺-release activated Ca²⁺ channel*), les pompes Ca^{2+} -ATPase (PMCA ou *plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) qui assurent un influx calcique du milieu extracellulaire. D'autre part, les échangeurs calciques (NCX ou *Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*) ou encore l'IP₃R (ou *IP3 receptor*) ou le RyR (ou *ryanodin receptors*) sont exprimés à la membrane du réticulum endoplasmique et sont impliqués dans la sécrétion du calcium à partir du réticulum endoplasmique vers le cytosol. Le stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique se fait par l'intermédiaire des pompes SERCA (ou *sarcoplasmic/ER Ca²⁺ ATPase*) et dans les mitochondries par l'intermédiaire des MCU (ou *mitochondrial Ca²⁺ uniporter*) exprimés à la membrane mitochondriale interne.

Le calcium intracellulaire est impliqué dans de nombreuses fonctions du système immunitaire. Il constitue un second messager essentiel dans la biologie du lymphocyte T. Il est sécrété dans le réticulum endoplasmique par le mécanisme de SOCE (ou *store-operated Ca²⁺ entry*). Il s'agit d'un mécanisme ubiquitaire liant la déplétion du calcium du réticulum endoplasmique à l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique permettant ainsi leur activation et le remplissage du stock intracellulaire en calcium. Le SOCE est induit par l'activation des récepteurs immunitaires notamment le TCR des lymphocytes T et le BCR des lymphocytes B, les récepteurs pour la partie Fc des immunoglobulines, les TLR (ou *toll like receptor*) ou encore les récepteurs aux chimiokines. La stimulation de ces récepteurs active la PLC qui hydrolyse les phospholipides de la membrane plasmique notamment le PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ induit la sécrétion du calcium du réticulum à travers l'IP₃R. La diminution de la concentration du calcium est détectée par la région N-terminale des STIM (ou *stromal interaction molecule*) qui s'oligomérisent et se transloquent dans des jonctions formées par l'ER et la membrane plasmique où ils interagissent par leur région C-terminale avec les composants des canaux CRAC, les protéines ORAI (ou *calcium release-activated calcium channel protein 1*) localisées à la membrane plasmique. Ces dernières s'activent en induisant un influx calcique du milieu extracellulaire à travers la membrane plasmique.

Chez l'Homme, des déficiences en ORAI et STIM dans les cellules immunitaires entraînent une immunodéficience sévère SCID (ou *severe combined immunodeficiency*) [241]. Une déficience génétique dans les STIM cause des désordres lymphoprolifératifs accompagnés d'une réduction du nombre de lymphocytes Trég [242]. D'autre part les

INTRODUCTION

canaux ORAI sont impliqués dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Ils sont induits et impliqués dans la désensibilisation du SOCE après l'activation des lymphocytes T [243]. Ces études n'ont pas permis de préciser le stade d'activation du lymphocyte T au cours duquel cette désensibilisation a lieu.

La signalisation dépendante du calcium intracellulaire a été très étudiée à cause de son rôle primordial dans la réponse immunitaire. En effet, le calcium s'accumulant dans le cytosol contrôle l'activité de plusieurs facteurs de transcription. Le calcium se lie à la protéine ubiquitaire calmoduline CaM (ou *Ca²⁺-sensitive protein calmoduline*) entraînant son changement de conformation. La CaM va alors se fixer à la calcineurine et l'activer. Cette dernière déphosphoryle les sous-unités cytoplasmiques des facteurs de transcription NFAT et NF- κ B, permettant ainsi leur translocation dans le noyau pour activer la transcription des gènes impliqués dans l'activation des lymphocytes T et B [244]. D'autre part, le calcium joue un rôle dans les fonctions cytotolytiques comme l'exocytose. Dans les cellules immunitaires, des concentrations élevées en calcium sont requises pour la dégranulation des mastocytes suite à leur activation par le récepteur au Fc des IgE (Fc ϵ RII), pour l'activation des cellules NK, des macrophages et des DC par le récepteur au Fc des IgG (Fc γ RIII) et aussi pour l'activation des lymphocytes T par le TCR et la sécrétion par les lymphocytes cytotoxiques des granules cytotolytiques contenant des perforines et des granzymes. Dans les cellules phagocytaires, bien qu'il ait été montré, en utilisant des chélateurs de calcium, que la phagocytose est indépendante du calcium, il semble qu'il soit important pour la fusion du phagosome avec le lysosome même si cela reste débattu [245,246]. De ce fait, la signalisation calcique semble être une cible thérapeutique intéressante comme le montre l'inhibition de la phosphatase calcineurine par les immunosuppresseurs cyclosporine A et FK506 (ou tacrolimus) lors du traitement des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la colite ulcéreuse et dans la prévention du rejet de greffe allogénique suite à une transplantation [241,247,248].

Les récepteurs purinergiques viennent s'ajouter à la liste des canaux calciques décrite ci-dessus. Une brève activation (de l'ordre de la milliseconde) du récepteur P2X7 par des concentrations micromolaires d'ATP ($> 100 \mu\text{M}$) permet l'ouverture d'un canal perméable aux cations qui conduit à la dépolarisation de la membrane (sortie de potassium et entrée de sodium) accompagnée d'une augmentation de la concentration du calcium cytosolique. De fortes quantités d'ATP (concentrations millimolaires) induisent l'ouverture d'un pore non sélectif perméable aux cations ayant un poids moléculaire supérieur à 900 Da. La sélectivité du canal aux cations est liée à des résidus dans le domaine TM2 puisque des mutations dans ses résidus (T348K, D352N, D352K) entraînent une perméabilité du récepteur aux anions [249]. Du fait de leur structure trimérique, les domaines transmembranaires (TM2) de chaque monomère du récepteur P2X7 forment un canal physique permettant l'entrée d'ions Na^+ et Ca^+ et la sortie d'ions K^+ [198]. Le mouvement des domaines TM2 permet une ouverture complète du canal et la conductance d'un courant électrique dont la direction est définie par le potentiel de membrane. Ainsi les courants électriques peuvent être mesurés par des techniques d'électrophysiologie comme le patch clamp appliqué à l'échelle de la cellule entière ou restreinte à la partie membranaire au contact de la pipette. En effet, quatre paramètres sont ainsi analysés : le

temps d'activation, l'amplitude du pic, la vitesse de désensibilisation suite à une stimulation continue par l'agoniste et la vitesse de la désactivation après le lavage de l'agoniste [200]. Tous ses paramètres varient en fonction de la concentration en agoniste sauf la vitesse de désactivation : le temps d'activation diminue et l'amplitude du pic et la vitesse de la désensibilisation augmente avec la concentration de l'agoniste [250]. .

La lignée HEK-293 transfectée par le récepteur P2X7 présente une élévation de la sécrétion de l'ATP ainsi que des concentrations calciques basales 3 à 4 fois plus élevées dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique comparée à la lignée transfectée par le vecteur vide (HEK-mock). L'utilisation de l'antagoniste du récepteur P2X7, oATP, ou encore d'apyrase ramène les concentrations basales en calcium mitochondrial dans les HEK-293 transfectées par le récepteur P2X7 au niveau de celles présentes dans les HEK-mock cultivées en absence de calcium extracellulaire. Cela a été corrélé à une augmentation dans le noyau de la quantité de l'isoforme c1 du facteur de transcription NFAT [251,252]. Ce travail montre donc que le récepteur P2X7 induit l'élévation du calcium mitochondriale et protège les cellules contre la mort cellulaire par un mécanisme impliquant le calcium. Budagian et coll ont montré que l'activation du récepteur P2X7 dans la lignée Jurkat induit l'expression et la sécrétion d'IL-2 suite à la phosphorylation et l'activation de la p56^{lck}, d'ERK (ou *Extracellular signal-regulated kinase*) et de JNK (ou *c-Jun N-terminal kinases*). Ces kinases activées vont ensuite phosphoryler le facteur de transcription AP-1. Les kinases ERK et JNK appartiennent à la famille des MAPK et sont responsables des événements cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. La p56^{lck} est une tyrosine kinase cytoplasmique responsable de la voie de signalisation en aval du complexe TCR/CD3 [253]. Plus récemment, un autre groupe a montré que l'ATP extracellulaire peut agir d'une façon autocrine pour induire l'activation des lymphocytes T. En effet, l'activation de la lignée Jurkat par son TCR induit une sécrétion rapide d'ATP (< 100 µM). L'ATP secrété agit sur les récepteurs P2X7 pour induire un influx calcique qui permet une activation du facteur de transcription NFAT et une production d'IL-2 [11]. En revanche d'autres groupes ont associé les concentrations élevées de calcium dans le réticulum endoplasmique à la mort cellulaire par la voie mitochondriale impliquant les protéines pro-apoptotiques Bax (ou *Bcl-2 associated X protein*) et BAK (ou *Bcl-2 homologous antagonist killer*). D'ailleurs la diminution de ses concentrations a un rôle protecteur contre l'apoptose [254]. De plus, le 4-aminopyridine (4AP), un médicament utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques pour sa capacité à inhiber les canaux potassiques et provoquer la dépolarisation de la membrane, induit un influx calcique et par conséquent la mort cellulaire. D'autre part, il a été montré que dans les cellules mononucléées humaines issus de sujets normaux cet effet est inhibé par le KN-62 suggérant que le récepteur P2X7 est impliqué dans ce processus [255]. De même, la stimulation par le calcitriol, une forme active de la vitamine D, inhibe l'influx calcique et réduit la perméabilité à l'éthidium induite par le récepteur P2X7. Plus récemment, des perturbations dans l'homéostasie du calcium intracellulaire ont été décrites associées à l'insuffisance rénale chez l'Homme. En effet, les stocks de calcium intracellulaire dans les monocytes du sang périphérique (PBMC ou *peripheral blood monocyte cells*) des patients ayant une insuffisance rénale sont augmentés par rapport à ceux des sujets normaux. La stimulation du récepteur P2X7 chez ces patients induit un influx calcique et une

perméabilité à l'éthidium moins élevés que chez des sujets normaux suggérant que le récepteur P2X7 est impliqué dans cette pathologie [256].

b) Ouverture d'un pore non sélectif

Le récepteur P2X7, tout comme les récepteurs P2X2 et P2X4, est capable d'induire la formation d'un pore perméable aux molécules dont la taille varie de 400 à 900 Da selon le type cellulaire. La formation du pore peut être mesurable en cytométrie en flux ou en microscopie à fluorescence par l'incorporation du NMDG⁺ (196 Da) et de sondes fluorescentes comme l'éthidium⁺ (314 Da) ou le YO-PRO-1²⁺ (376 Da) [257]. La formation du pore est l'activité du récepteur P2X7 la plus étudiée et celle qui a fait couler le plus d'encre depuis le clonage du gène codant pour le récepteur P2X7. Malgré les nombreuses avancées ayant permis la détermination de la cinétique de formation du pore ainsi que les domaines protéiques du récepteur qui sont responsables de sa constitution, les mécanismes de sa formation ne sont pas complètement résolus.

En effet, le domaine TM2 du récepteur P2X7 et son extrémité C-terminale intracellulaire semblent importants pour la formation du pore et la mort cellulaire puisque l'activation du récepteur dans sa version mutée ou tronquée au niveau des derniers 177 résidus de l'extrémité C-terminale entraînent une inhibition de la mort cellulaire et une réduction du taux d'incorporation du YO-PRO-1 [195,196,198,258]. Cependant, l'implication de l'extrémité C-terminale dans la formation du pore a été questionnée notamment par le travail de Tomasinsig et coll. Ces auteurs ont montré que la lignée HEK-293, bien qu'exprimant une version tronquée du récepteur P2X7 au niveau de la partie C-terminale, était capable de former un pore perméable à l'éthidium après stimulation par le peptide antimicrobien humain LL-37 [259].

D'autre part, et dans le but de déterminer la cinétique de formation du pore P2X7, les travaux de Virginio et coll ont montré, dans la lignée HEK-293 transfectée par un récepteur P2X7 de rat, que le pore P2X7 se forme en 3 secondes après activation par l'ATP et que le taux de formation du pore atteint un plateau en 10 à 30 secondes [257].

Par ailleurs, deux mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer la formation du pore : le premier considère que le pore est le résultat d'une dilatation progressive du canal P2X7 suite à une activation continue par l'ATP. Il s'agit donc d'un mécanisme intrinsèque au récepteur P2X7. Ce mécanisme de dilatation du canal a été proposé parce que la cinétique de mesure de la formation du pore réalisée sur la lignée HEK-293 transfectée par le récepteur P2X7 de rat montre que le diamètre du pore détecté après 3 secondes de stimulation par l'agoniste est de 0.8 nm et atteint 3 à 5 nm après 25 secondes [257]. Un modèle, appelé le modèle de Markov, a ainsi été proposé pour la dilatation du pore P2X7 : la fixation d'une molécule d'ATP sur une sous-unité de P2X7 cause une asymétrie dans le récepteur qui empêche la fixation d'une deuxième molécule d'ATP. La fixation d'une deuxième molécule requiert donc une plus forte concentration d'ATP pour l'ouverture du canal et le passage des cations de petites tailles. Finalement, la fixation de la troisième molécule d'ATP requiert une plus forte énergie, à cause de l'asymétrie devenue encore plus grande, pour provoquer un changement de conformation du récepteur et donc une activation complète du récepteur P2X7 [260].

INTRODUCTION

Le deuxième mécanisme consiste à postuler que la formation du pore requiert la présence de protéines associées au récepteur P2X7 par son long domaine intracellulaire, en l'occurrence la pannexine-1. Il s'agit d'un membre de la famille des héli-canaux formé par deux sous-unités et exprimé principalement à la membrane plasmique des cellules immunitaires. L'implication de la pannexine-1 dans la formation du pore P2X7 a été déterminée à l'aide des petits ARN interférents, d'inhibiteurs pharmacologiques comme la cabénoxolone (CBX), ou encore de peptides mimant les 10 premiers résidus de la première boucle extracellulaire de la pannexine-1 humaine (¹⁰pan) [261]. Ainsi, il a été montré que l'inhibition de la pannexine-1 bloque l'incorporation de la sonde YO-PRO-1 mais pas l'influx calcique ces deux activités étant induites par une stimulation avec le Bz-ATP. La délétion de la totalité de l'extrémité C-terminale du récepteur P2X7 cloné dans la lignée HEK-293 n'affecte pas l'influx calcique à travers le canal P2X7 mais par contre réduit l'incorporation de molécules YO-PRO-1 [195]. D'autre part, le polymorphisme P451L au niveau de la queue C-terminale du récepteur P2X7 de la souris B6 entraîne, dans les macrophages, une inhibition de la formation du pore mais pas de l'ouverture du canal calcique [260]. Un autre argument en faveur de l'implication de la pannexine-1 dans la formation du pore est la mise en évidence, par des expériences de co-immunoprécipitations, d'interactions physiques entre le récepteur P2X7 et la pannexine-1 [262]. D'autre part, il a été montré que l'activation du TCR des lymphocytes T induit une translocation dans la synapse immunologique des récepteurs P2X1 et P2X4 ainsi que de la pannexine-1 par laquelle se fait la sécrétion d'ATP. Quant au récepteur P2X7 sa distribution à la surface membranaire reste uniforme. L'ATP sécrétée dans la synapse immunologique active les récepteurs P2X1, P2X4 et P2X7 facilitant, ainsi, l'influx calcique et permettant la production d'IL-2 et donc une activation complète du lymphocyte T [263]. Cependant, des études récentes utilisant des souris déficientes pour la pannexine-1 (pannexine-1 KO) ont contredit l'implication de celle-ci dans la formation du pore dépendant du récepteur P2X7. Par exemple, Qu et coll montrent que l'incorporation des molécules YO-PRO-1 a bien lieu en réponse à l'ATP dans les macrophages de la moelle osseuse des souris pannexine-1 KO préalablement traitées par du LPS. En revanche, une inhibition de la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 après la stimulation des macrophages par l'ATP, ainsi que de la mort cellulaire des thymocytes induite par l'ATP, est observée dans les souris pannexine-1 KO [264].

Récemment et comme mentionné précédemment, il a été décrit que la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules du cytosquelette présentant des propriétés anti-inflammatoires, réduit certaines des activités du récepteur P2X7 comme la formation du pore, la production des ROS et des NO et la sécrétion d'IL-1 β mais pas l'activité canal. Cela a été réalisé *in vitro* sur des macrophages péritonéaux ainsi qu'*in vivo* sur des souris préalablement traitées par de la colchicine et ensuite injectées par du LPS et de l'ATP [230]. Cette même étude montre que la colchicine est aussi capable de bloquer la formation du pore dépendant du récepteur P2X2. Or, l'inhibition, par des inhibiteurs pharmacologiques, de la pannexine-1 n'a pas d'effets sur la formation du pore des cellules HEK-293 transfectées par le récepteur P2X2. Cela suggère que le pore inhibé par la colchicine est indépendant de la pannexine-1 [260,265].

INTRODUCTION

Deux travaux indépendants ont montré que le pore induit par le récepteur P2X7 est un phénomène plus complexe du fait de sa sélectivité différente aux sondes fluorescentes selon le type cellulaire. Un premier travail utilisant la technique de patch-clamp pour étudier la formation du pore dans la lignée HEK-293 et les macrophages murins montre qu'il existe deux types de pore : cationique et anionique. Ainsi, la lignée HEK-293 transfectée par le récepteur P2X7, contrairement aux macrophages, n'était pas capable d'incorporer la sonde anionique, Lucifer Yellow. De plus, l'incorporation des sondes anioniques par les macrophages était possible à 37 °C et à 4°C alors que l'incorporation des sondes cationiques comme le YO-PRO-1 et l'éthidium ne se produisait qu'à 37°C [266]. Un autre groupe a montré que la lignée HEK-293 transfectée par le récepteur P2X7 de rat est capable de former le pore anionique, mesuré par l'incorporation de la sonde anionique Lucifer Yellow, à condition que du calcium soit présent dans le milieu extracellulaire. En revanche, la lignée macrophagique de souris RAW 264.7 est capable de former les deux types de pores ; anionique et cationique, et cela indépendamment de la concentration en calcium [267]. De plus, dans ces deux travaux, l'implication de la pannexine-1 a été exclue du fait que les inhibiteurs pharmacologiques CBX et mefloquine n'avaient pas d'effets sur l'incorporation des sondes.

Enfin, il a été postulé que la formation du pore induite par le récepteur P2X7 est associée aux autres activités du récepteur. Donnelly-Roberts et coll ont essayé de tracer la cascade de signalisation régulant la formation du pore. Ils ont montré que la voie de signalisation dépendante de l'activation de la p38 MAPK et des caspases 1 et 3 est requise pour la formation du pore dans la lignée monocyttaire humaine THP-1. De plus, cette même étude a montré que des inhibiteurs de caspases-1, responsable de la maturation de l'IL-1 β et aussi de la caspase effectrice 3, inhibent comme attendu la sécrétion d'IL-1 β mais aussi de façon plus surprenante l'incorporation du YO-PRO-1 [257,268]. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Faria et coll sur la lignée épithéliale thymique (2BH4) et des macrophages péritonéaux [269]. En effet, la technique de patch-clamp sur cellules en configuration attachée à la pipette montre que l'ATP induit la formation du pore aussi bien sur la partie de la membrane en contact avec la pipette de patch que sur le reste de la membrane suggérant ainsi l'existence d'un second messager impliqué dans la formation du pore. D'autre part, la formation du pore est dépendante du calcium de façon dose-dépendante ce qui suggère qu'il est un second messager important pour relier l'activité canal du récepteur P2X7 à son activité pore. Mackenzie et coll ont décrit une association entre la formation du pore et l'activité cytotoxique du récepteur P2X7 [270]. D'autre part, Marques-Da-Silva et coll ont observé que la réduction de la formation du pore suite au traitement par la colchicine avait des effets inhibiteurs sur la sécrétion d'IL-1 β et la production des ROS mais était sans effets sur la mort cellulaire suggérant que l'activité pore peut être associée à l'activité de sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires du récepteur P2X7 [230].

Toutes ses études mettent en évidence la complexité de l'activité de formation du pore P2X7 et suggèrent qu'effectivement plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu selon le type cellulaire. D'autres études sont donc nécessaires afin de déterminer tous les acteurs potentiels qui y sont associés.

c) Externalisation de la PS et mort cellulaire

La PS est un amino-phospholipide dont l'expression est ubiquitaire. Elle représente 3 à 15% du total des phospholipides présents dans la cellule. Sa répartition varie entre les différentes membranes des organites : elle est plus abondante dans les membranes plasmiques et les endosomes mais très peu présente dans la membrane mitochondriale interne. Une caractéristique majeure de la PS est sa distribution asymétrique entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique membranaire : elle est plus exprimée dans le feuillet interne que le feuillet externe. Trois types de protéines ou translocases assurent le transport des lipides d'une couche à l'autre : flippase, floppase, scramblase. Les deux premières sont responsables du maintien de l'asymétrie, la troisième de la perte d'asymétrie. L'asymétrie de la PS est maintenue principalement par un équilibre entre deux mécanismes : 1- le « flip », un mouvement ATP-dépendant de la flippase qui assure la translocation de la PS de la couche externe vers la couche interne de la membrane ; 2- le « flop », un mouvement ATP-dépendant de la PS de la couche interne vers la couche externe. La « scramblase » permet un mouvement dépendant du calcium mais indépendant de l'ATP permettant la randomisation non spécifique de la PS dans la bicouche lipidique [271]. Cette asymétrie de la PS est régulée par de nombreux processus physiologiques. Par exemple lors de la coagulation sanguine, la PS est exposée à la membrane externe des plaquettes activées. Par voie de conséquence, les facteurs de coagulation V, VIII, X et la prothrombine sont recrutés à la surface des plaquettes pour générer la fibrine et donc stabiliser le processus de thrombus [272]. D'autres phénomènes physiologiques comme la dégranulation des mastocytes et des plaquettes et la sénescence des érythrocytes requièrent l'exposition de la PS à leur surface externe. D'autre part, l'externalisation de la PS (signal « *eat me* ») est une caractéristique majeure de l'apoptose car elle permet la reconnaissance spécifique des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires et donc leur phagocytose. L'apoptose peut être activée par plusieurs stimuli impliquant deux voies principales de signalisation :

- La voie extrinsèque qui est activée par l'engagement des récepteurs de mort, comme Fas (ou *apoptosis stimulation fragment*), le récepteur au TNF- α (ou *tumor necrosis factor*) de type 1 ou encore TRAIL (ou *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*), par leurs ligands conduit au recrutement des protéines adaptatrices FADD (ou *Fas Associated Death Domain*), à travers leur domaine de mort (ou *Death Domain*), puis des caspases initiateuses 8 ou 10 sous leur forme inactive ou procaspase. Le clivage des procaspases initiateuses cause leur activation et déclenche la cascade d'activation des caspases effectrices dont la caspase 3 qui à son tour active d'autres caspases effectrices comme les caspases 6 et 7 entraînant le clivage des substrats vitaux de la cellule et l'activation de la DNase, CAD, responsable de la dégradation de l'ADN.
- La voie intrinsèque ou mitochondriale est activée par des signaux de stress comme la déprivation en facteurs de croissance. Elle implique l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 dont Bax et Bak. L'oligomérisation de ces protéines entraîne la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe entraînant la libération du cytochrome c dans le cytosol où il va s'associer à la protéine adaptatrice APAF1 et induire son oligomérisation.

L'oligomérisation d'APAF-1 s'accompagne du recrutement de la procaspase initiateur 9 et la formation de l'apoptosome responsable de l'activation de la procaspase 9. La caspase-9 active à son tour les caspases effectrices.

Dans les cellules de type I comme les lymphocytes, la voie extrinsèque est suffisante pour induire l'apoptose. En revanche dans les cellules de type II, comme les hépatocytes, une quantité insuffisante de caspases 8 est produite ce qui nécessite une amplification par l'intermédiaire de la protéine Bid, un membre de la famille de Bcl2, qui est clivée par la caspase 8 pour générer la forme tBid (ou *truncated Bid*) qui à son tour active Bax/Bak et donc la voie mitochondriale [273].

D'autre part, la PS présente des affinités pour plusieurs protéines dont l'annexine V qui fait parti de la superfamille des annexines. Il s'agit d'une protéine soluble qui se fixe, en présence de calcium, sur les phospholipides chargés négativement. L'annexine V a été caractérisée comme une protéine anticoagulante exprimée par les vaisseaux sanguins. La fixation de l'annexine V à la PS est utilisée comme un outil pour mesurer *in vitro* la mort cellulaire. En effet, l'annexine V recombinante peut être couplée à des fluorochromes ce qui permet de quantifier, en microscopie ou bien en cytométrie en flux, les cellules apoptotiques exprimant la PS à leur surface. Souvent son utilisation en cytométrie en flux est combinée avec des marqueurs fluorescents de l'ADN, comme l'IP (ou iodure de propidium), le 7AAD (ou *7-Aminoactinomycin D*) ou le DAPI (ou *4',6'-diamidino-2-phénylindole*), pour distinguer les cellules apoptotiques (Annexine V⁺ PI⁻), les cellules nécrotiques (Annexine V⁻ PI⁺) et les cellules en apoptose tardive ou encore aponecrotiques (Annexine V⁺ PI⁺). L'aponecrose est un phénomène dans lequel les cellules apoptotiques, du fait de l'absence des cellules phagocytaires, entrent en nécrose et incorporent l'IP.

Le récepteur P2X7 a été décrit comme un récepteur cytolitique conduisant à la mort cellulaire notamment dans les cellules myéloïdes, les thymocytes, les macrophages, les DC et les lymphocytes. Les mécanismes de mort cellulaire engagés diffèrent selon le type cellulaire et le temps de stimulation [274]. Dans la lignée HEK-293 transfectée par le récepteur P2X7, le traitement par l'ATP induit l'activation de la caspase-3 et le clivage de la PARP (ou *polyADP-ribose polymerase*) [275]. D'autre part, la stimulation par l'ATP de la lignée murine de macrophages Bac 1 induit une apoptose par un mécanisme impliquant la kinase SAPK/JNK (ou *stress-activated protein kinase*) et la caspase-3 [276]. De même, il a été montré dans les thymocytes que la stimulation par l'ATP induit une nécrose et non pas une apoptose et cela passe par un mécanisme impliquant la phosphorylation des protéines MAPK (ERK1/2) d'une façon indépendante du calcium intracellulaire [277]. En revanche, l'apoptose induite dans les DC suite à l'engagement du récepteur P2X7 semble être indépendante des caspases 1 et 3 [278]. Les travaux d'Elliot et coll ont montré que l'ATP et l'UTP libérés de façon caspase-dépendante par les cellules apoptotiques, notamment les thymocytes, la lignée lymphocytaire T Jurkat et les cellules épithéliales, constituent un signal de danger important participant au recrutement des cellules apoptotiques par l'intermédiaire du récepteur P2Y2 (signal « *find me* ») [279]. D'autre part, Aguirre et coll ont montré qu'il existe une connexion entre le récepteur de mort Fas et le récepteur P2X7 dans la lignée lymphocytaire T Jurkat. En effet, l'engagement du

récepteur Fas cause l'activation de la caspase-8 suivie de la libération d'ATP à travers la pannexine-1 qui agit à son tour sur les récepteurs P2X7 pour induire l'apoptose par l'activation de la caspase-9 [280].

D'autres groupes se sont intéressés à la différence de sensibilité à la mort cellulaire et à l'externalisation de la PS induite par le récepteur P2X7 dans les différents lymphocytes T selon leur stade de maturation ou d'activation. Ainsi, Courageot et coll ont étudié l'exposition de la PS dans les thymocytes murins. Ils ont montré que les thymocytes matures $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$ sont plus sensibles à l'ATP que les thymocytes immatures $CD4^-CD8^-$ et que cette plus grande sensibilité est due à une plus forte expression membranaire du récepteur P2X7. De plus, le mécanisme d'externalisation de la PS dans les lymphocytes T spléniques, mais pas dans les thymocytes ni les hépatocytes, semble être dépendant de l'élévation du calcium et du sodium intracellulaires suite à l'activation du canal P2X7 [281]. Concernant les lymphocytes T périphériques, le groupe d'Aswad et coll ont montré que les lymphocytes Trég $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ est la population la plus sensible à la mort cellulaire induite par le NAD et l'ATP. A l'inverse, les lymphocytes T conventionnels présentent une sensibilité réduite à la mort cellulaire, les lymphocytes T helper $CD4^+$ étant plus sensibles que les lymphocytes cytotoxiques T $CD8^+$ [282]. En contradiction avec ce travail, le groupe de Taylor, a proposé que la moindre sensibilité à l'ATP, mise en évidence par l'exposition de la PS et la mort cellulaire, soit due à l'expression membranaire de la molécule CD45RB. Ainsi les lymphocytes Trég ou conventionnels exprimant des taux réduits en molécules CD45RB ($CD45RB^{low}$) sont plus sensibles à la mort cellulaire induite par le récepteur P2X7 que les lymphocytes T exprimant des taux élevés de CD45 ($CD45^{high}$) [283]. Après les travaux d'Adriouch et coll en 2001 sur l'activation du récepteur P2X7 par le NAD (cf. **3A ii**), Haag et coll ont comparé la mort induite par le NAD dans les différentes sous-populations de lymphocytes T selon leur stade de développement. Leurs résultats ont montré que les lymphocytes T matures au repos sont plus sensibles à la mort induite par le NAD que les thymocytes et les lymphocytes activés. Les auteurs ont lié cette différence de sensibilité à l'expression d'ART2.2 responsable de l'ADP ribosylation [213]. En outre, il a été montré que les thymocytes murins sont sensibles à la mort cellulaire après activation du récepteur P2X7 et que ce processus est indépendant de l'influx calcique et de la PLD mais dépend de la queue C-terminale du récepteur. Ainsi le même travail a montré que l'externalisation de la PS a lieu dans les thymocytes de souris BALB/c après 15 mn de stimulation par l'ATP et qu'une stimulation continue cause une dégradation de l'ADN qui atteint son maximum après 5h de stimulation et cela indépendamment de la concentration en calcium extracellulaire. De plus, les thymocytes de BALB/c présentent une lyse cellulaire détectable à partir de 45 min d'incubation avec BzATP [284].

Dans certains cas, l'externalisation de la PS n'est pas associée à la mort cellulaire. En effet, Mackenzie et coll ont décrit un mécanisme de pseudo-apoptose après une brève stimulation par l'ATP (5 à 10 secondes) pendant laquelle ont lieu des événements caractéristiques de l'apoptose, notamment l'augmentation de la perméabilité mitochondriale, l'augmentation du taux de calcium cytosolique et mitochondrial, l'externalisation de la PS et le blebbing de la membrane. Or, les cellules ne meurent pas, au contraire, ces événements sont inversés dès l'élimination de l'agoniste. A l'inverse, une

activation prolongée par l'ATP (2 heures) induit la sécrétion du cytochrome C et l'activation de la caspase-3 de façon indépendante du calcium [270]. En parallèle, les travaux d'Elliot et coll ont montré que l'externalisation de la PS dans les lymphocytes T périphériques n'était pas associée à l'apoptose. De plus, ces travaux proposent un rôle de la PS dans la transduction du signal notamment dans les autres activités induites par le récepteur P2X7 comme l'influx de Ca^{2+} et de Na^+ , le clivage de la molécule de homing CD62L. Les auteurs concluent donc que les activités du récepteur P2X7 sont associées dès que le récepteur P2X7 est engagé [285]. D'autres travaux du même groupe, décrivent que l'exposition de la PS après la stimulation du récepteur P2X7 implique un mécanisme dépendant de l'efflux de potassium à travers les canaux potassiques KCa3.1 [286].

L'externalisation de la PS et la mort cellulaire, dépendantes du récepteur P2X7, ont été étudiées dans différents types cellulaires dont les lymphocytes T. Or, quelques questions restent encore ouvertes concernant l'existence ou non d'un mécanisme physiologique d'externalisation de la PS induite par le récepteur P2X7 dans les lymphocytes T indépendamment d'une mort cellulaire qui serait comparable au processus d'activation des plaquettes. Dans ce cas, quelle serait l'implication d'une telle externalisation de la PS dans la physiologie du lymphocyte T ? Des études plus détaillées sont également nécessaire concernant la sensibilité à l'externalisation de la PS et à la mort cellulaire des sous-populations de lymphocytes T à leurs différents stades d'activation : naïf, récemment activé, mémoire central, mémoire périphérique.

d) Clivage des molécules transmembranaires: cas de la molécule CD62L

L'adhérence cellulaire recouvre l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre par les cellules pour adhérer entre elles ou avec le milieu environnant. C'est un processus fondamental pour la vie cellulaire dans la mesure où il régule la prolifération et la mort des cellules ainsi que leur migration dans les organes grâce à des interactions entre des récepteurs et des ligands exprimés sur les cellules migrantes et les cellules de la matrice extracellulaire. Dans le cas des leucocytes sanguins, la cascade de migration à travers l'endothélium vasculaire est bien définie, elle commence par des interactions de faible affinité entre des molécules d'adhérence et leurs ligands exprimés à la surface des cellules endothéliales provoquant ainsi une première étape de roulade des leucocytes (ou *rolling*) dans le sens du flux sanguin. La roulade cause une seconde étape d'adhérence qui est stable (ou *arrest*) et caractérisée par une plus grande affinité entre les molécules d'adhésion et leurs ligands. La dernière étape de la domiciliation (ou homing) est la migration transendothéliale ou diapédèse dans laquelle les leucocytes passent à travers les cellules endothéliales et migrent en suivant un gradient de concentrations de chimiokines [287]. La première étape d'adhésion et de roulade implique l'expression au niveau des leucocytes de la molécule CD62L ou L-sélectine alors que l'étape d'adhésion stable et la transmigration impliquent l'expression d'intégrines [288, McEver, 2010 #1309] (cf. **Figure 6**).

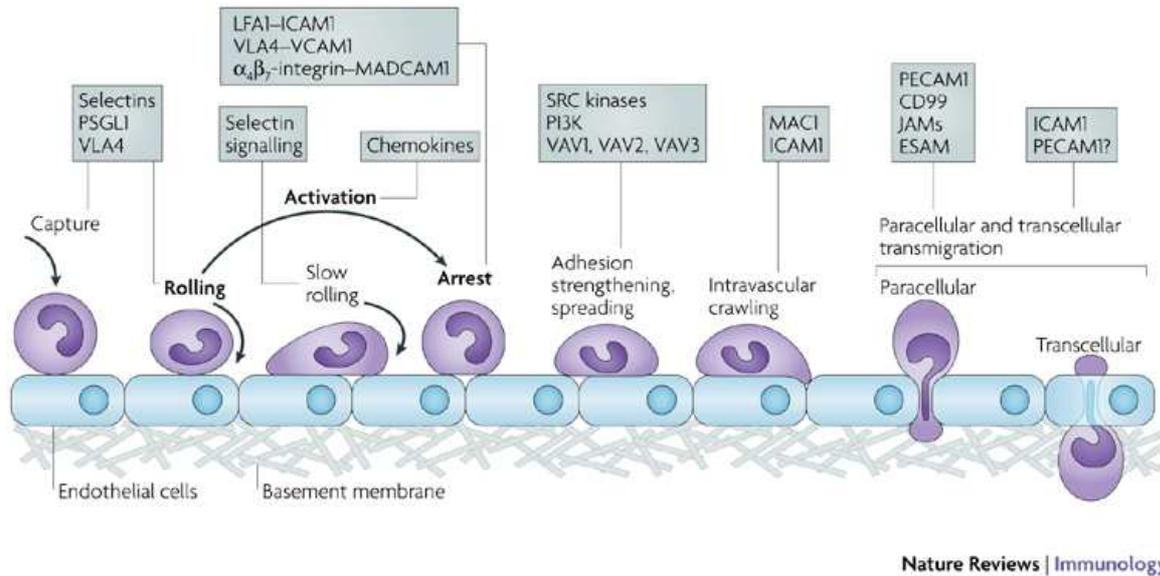


Figure 6 : Cascade d'adhésion des leucocytes

Les trois étapes montrées en gras : la roulade dépendante des sélectines, l'activation dépendante des chimiokines et l'adhésion ferme dépendante des intégrines. Les molécules clés impliquées dans chaque étape sont présentées dans des boîtes bleues [288]. ESAM : *endothelial cell-selective adhesion molecule*, ICAM1: *intercellular adhesion molecule 1*, JAM: *junctional adhesion molecule*, LFA1: *lymphocyte function-associated antigen 1* ou $\alpha_4\beta_2$ -*integrin*, MAC1 : *macrophage antigen 1*, MADCAM : *mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1*, PSGL1: *P-selectin glycoprotein ligand 1*, PECAM1 : *platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1*, VCAM : *vascular cell-adhesion molecule 1*, VLA4 : *very late antigen* ou $\alpha_4\beta_1$ -*integrin*.

La molécule CD62L est une glycoprotéine d'adhérence transmembranaire de type I appartenant à la famille des sélectines. Elle est exprimée à la surface des leucocytes circulants et participe à leur migration à travers l'endothélium des vaisseaux des organes lymphoïdes et des sites d'inflammatoires, ce processus est appelé domiciliation ou « homing ». Toutes les sélectines, E- (pour endothéliales), L- (pour leucocytes) et P- (pour plaquettes), possèdent un domaine extracellulaire d'interaction aux carbohydrate sialyl Lewis X (sLe^x) et un domaine N-terminal intracellulaire. Les ligands de la molécule CD62L sont les mucines GlyCAM-1 (ou *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), CD34 et podocalyxine exprimées sur les cellules endothéliales ainsi que la glycoprotéine PSGL (ou *p-selectin glycoprotein ligand-1*) exprimée à la surface des autres leucocytes [289].

Le récepteur P2X7 est impliqué dans le trafic de plusieurs protéines transmembranaires, importantes pour la réponse immunitaire, en induisant leur clivage protéolytique. Parmi les protéines concernées par ces voies de sécrétion non-classiques dépendantes de l'ATP, on trouve, notamment, les molécules CD62L, TNF- α , CD23, CD27, la métalloprotéase MMP-9 ou encore le récepteur à l'IL-6 [290]. Le clivage de ces molécules se fait par des enzymes de la famille ADAM (ou *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*) dont l'activation peut se faire par le calcium, la production de ROS ou la phosphorylation par les PKC ou les MAPK [291].

Il a été montré que les molécules CD23 et CD62L sont clivées après stimulation par le récepteur P2X7 par l'intermédiaire, respectivement, des ADAM 10 et 17. Ainsi des concentrations anormalement élevées des formes solubles des molécules CD23 et CD62L sont retrouvées dans le sérum des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) B [292,293]. Il est important de noter que le sérum humain normal contient 1 à 2 mg/ml

de molécules CD62L solubles et que ce taux augmente en cas d'inflammation [287]. Dans un travail précédent, notre laboratoire a montré que chez les souris déficientes pour ADAM 17, la métalloprotéase ADAM 10 est capable de cliver les substrats d'ADAM 17 notamment les molécules TNF- α , TGF- α , ICAM et CD62L ainsi que le récepteur à l'IL-6 [294]. L'activation d'ADAM 10 est dépendante du calcium mais pas celle d'ADAM 17. D'autre part, un des acteurs essentiels du clivage de CD62L est la protéine CaM (*ubiquitous calcium (Ca²⁺)-binding protein calmodulin*), qui, dans les leucocytes au repos, se lie au domaine cytoplasmique et à une partie du domaine transmembranaire de la molécule CD62L conduisant cette dernière à adopter une conformation plus compacte afin d'empêcher son clivage protéolytique [295]. Cette étude est en partie contestée par un autre groupe qui a montré que la CaM ne peut pas interagir avec le domaine transmembranaire de CD62L. De plus, elle adopte dans les cellules une conformation étendue au moment de son interaction avec le domaine cytoplasmique de CD62L par l'intermédiaire de la moésine. Enfin, dans le cas des cellules au repos, la bicouche riche en PS interagit avec CD62L ce qui bloque son interaction avec la CaM [296, 297].

Des expériences de cinétique ont montré que le clivage de la molécule CD62L a lieu après 20 mn d'activation des leucocytes par les cytokines. Or, la migration transendothéliale des leucocytes est réalisée en 6 mn environ. Cela suggère donc que le clivage de la molécule CD62L a lieu après la migration transendothéliale. La partie clivée de la molécule CD62L, aussi appelée ectodomaine, est capable d'interagir avec les mêmes ligands et peut entrer en compétition avec la forme membranaire des molécules CD62L [287]. D'autre part, il a été montré que les protéines ERM (ou *ezrin-radixin-moesin*) interagissent avec les molécules CD62L favorisant ainsi la première étape d'adhésion au cours du chimiotactisme et son clivage [287]. En effet, les ERM sont des protéines du cytosquelette associées à de nombreuses protéines membranaires comme les récepteurs d'adhésion, les canaux ioniques et les régulateurs du trafic vésiculaire. De ce fait, les ERM, dont la fonction est de connecter la membrane plasmique au cytosquelette d'actine, sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la régulation de la forme, l'adhésion et la motilité, la localisation subcellulaire, le trafic des vésicules intracellulaire et la transduction du signal [298].

Récemment, une étude a montré que les lymphocytes T naïfs CD4⁺ du sang périphérique humain sont très sensibles au clivage de la molécule CD62L induit par l'ATP avec un pic de clivage environ 15 mn après la stimulation. De façon surprenante, et contrairement à ce qui a été observé dans les lymphocytes T CD4⁺ murins, les lymphocytes T CD4⁺ humains sont résistants à l'externalisation de la PS induite par la stimulation du récepteur P2X7. De plus, une forte production de ROS suite à l'inhibition des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale induit un clivage de la molécule CD62L ainsi qu'une forte externalisation de la PS suggérant que ces deux activités du récepteur P2X7 sont liées entre elles et qu'elles sont dépendantes de la production de ROS intracellulaires [299] (*cf Figure 7*).

Ces études montrent le rôle important joué par le récepteur P2X7 dans le homing des lymphocytes T et donc dans la modulation de la réponse immunitaire. D'autres études sont encore nécessaires pour préciser la sensibilité des sous-populations de lymphocytes T, à des stades d'activation plus avancés, au clivage de la molécule CD62L.

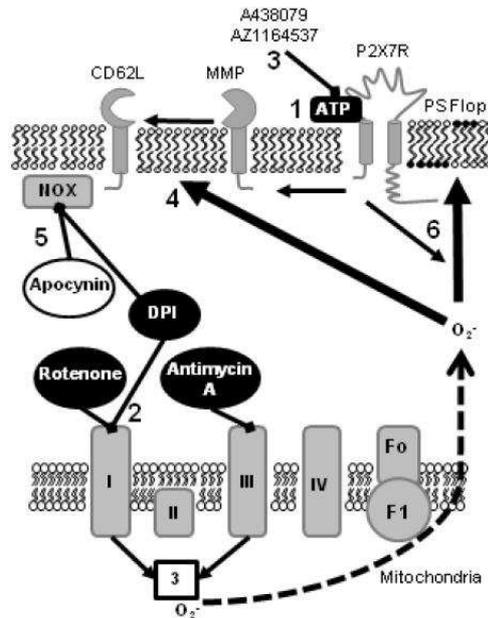


Figure 7 : Actions de la chaîne respiratoire mitochondriale sur le clivage de la molécule CD62L et l'externalisation de la PS.

1. La stimulation par l'ATP induit le clivage de la molécule CD62L par les MMP. 2. L'inhibition des complexes I et III, respectivement, par la rotenone et l'antimycine A cause 3. la production d'anions superoxydes. 4. Le prétraitement par ces inhibiteurs ainsi que le DPI, un inhibiteur du complexe I, mais pas avec l'apocynin, un inhibiteur de la NADPH oxydase, induit le clivage de la molécule CD62L par une voie dépendante de l'ATP. 6. Le prétraitement par la rotenone et l'antimycine induit l'externalisation de la PS. DPI : diphenyleiodonium, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate [299].

Le rôle du récepteur P2X7 dans le clivage de protéines de surface ne se restreint pas à des molécules d'intérêts immunologiques. Par exemple Delarasse et coll. ont montré que le récepteur P2X7 est fortement exprimé dans les plaques séniles de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer (souris Tg2576) et chez les patients atteints de cette maladie. De plus, l'activation du récepteur P2X7, de lignées de neuroblastomes humain et murin ainsi que dans les astrocytes primaires de souris, induit un clivage de l'APP (ou *amyloid precursor protein*) par une α -secrétases et la génération du peptide soluble neuroprotecteur sAPP α [300]. L'APP est une protéine transmembranaire exprimée par les neurones, les astrocytes, la microglie et les cellules souches neuronales du système nerveux central. Elle peut être clivée à des différents sites par des β et γ secrétases générant les peptides neurotoxiques, β -Amyloïdes, responsables de la formation des plaques amyloïdes chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'APP peut aussi être clivée par l' α -secrétase pour générer les fragments solubles sAPP α qui, à l'inverse, ont des propriétés neuroprotectrices car produits par le clivage du peptide β -amyloïde bloquant ainsi sa production. Le mécanisme par lequel le récepteur P2X7 induit la sécrétion du peptide soluble sAPP α est indépendant de la signalisation calcique et des activités ADAM 9, 10 et 17 mais implique la phosphorylation des Erk1/32 et de JNK [300]. Le même groupe a récemment montré que l'activation du récepteur P2X7 cause la phosphorylation des ERM nécessaire pour le clivage des APP et la génération des fragments sAPP α (cf. **Figure 8**).

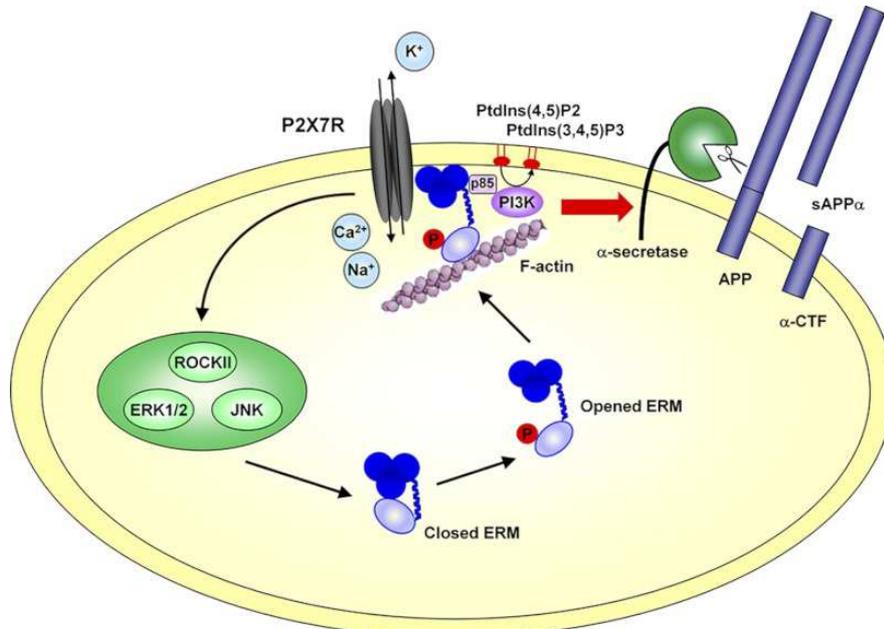


Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans le clivage de l'APP par le récepteur P2X7.

L'activation du récepteur P2X7 induit un influx calcique activant la Rho kinase, Erk1/2 et JNK. Ces kinases phosphorylent les ERM induisant leur changement conformationnel et leur translocation vers la membrane plasmique où ils interagissent avec le récepteur P2X7. Le complexe formé des ERM, de la F-actine et du récepteur P2X7 activerait l' α -secrétase et donc le clivage de l'APP et la génération du fragment sAPP α . La PI3K semble agir en aval des ERM pour phosphoryler l'ezrine. ROCKI : Rho kinase II; CTF : C-terminal fragment [298].

e) Maturation et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires

Le récepteur P2X7 est considéré comme un acteur essentiel de l'inflammation du fait de son rôle dans la maturation par coupure protéolytique de médiateurs inflammatoires et leur sécrétion.

Les cytokines IL-1 α , IL-1 β et IL-18, membres de la superfamille de l'IL-1, sont des cytokines pro-inflammatoires sécrétées majoritairement par les monocytes, les macrophages et les DC lors d'inflammations aiguës et chroniques [301]. Les cytokines de la famille IL-1 exercent leurs activités pro-inflammatoires en induisant l'expression de la NO synthase et donc la production de NO, l'expression des molécules d'adhérences sur les cellules endothéliales et donc l'extravasation des leucocytes, la fièvre et l'activation des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse [302].

L'engagement du TLR4 après un stimulus inflammatoire comme le LPS, constitue un signal d'activation des facteurs de transcription NF- κ B et/ou la voie de signalisation des MAPK. Les protéines pro-IL-1 β , pro-IL-1 α et pro-IL-18 s'accumulent dans le cytoplasme après leur synthèse [301]. Alors que la pro-IL-1 α est synthétisée sous forme active, la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 nécessitent une étape supplémentaire de maturation et de clivage par la caspase-1 (appelée initialement ICE ou *IL-1 β converting enzyme*) pour générer la cytokine mature de, respectivement, 17 kDa et 24 kDa de masse moléculaire. Les cytokines IL-1 α et IL-1 β se fixent sur le même récepteur appelée IL-1RI, alors que l'IL-18, encore appelée *interferon-gamma inducing factor* pour sa capacité à induire la production de l'IFN- γ en synergie avec l'IL-12, se fixe sur son récepteur pour induire la synthèse des cytokines aussi bien de type Th1 (IFN- γ , TNF- α et IL-1 β) que Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) et d'autres médiateurs proinflammatoires (comme le CD95 ligand ou FAS-ligand et le GM-CSF) selon le type cellulaire.

INTRODUCTION

La pro-caspase-1, qui est constitutivement exprimée dans les monocytes et les macrophages, est aussi synthétisée sous une forme inactive et nécessite une étape de maturation par clivage protéolytique de son extrémité C-terminale générant les deux sous-unités p10 et p20 formant la caspase-1 active. Le clivage de la pro-caspase-1 est dépendant de la formation d'un complexe protéique connu sous le nom d'inflammasome NLRP3 ou NALP3 composé d'au moins 5 protéines : caspase-1 (parfois la caspase-5 encore appelée caspase 11), NALP3 (ou *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*) et ASC (ou *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). L'assemblage de l'inflammasome entraîne le rapprochement des monomères de pro-caspases-1 et leur association à NALP3 par l'intermédiaire du domaine CARD de la protéine ASC ce qui induit le clivage de la pro-caspase-1 en caspase-1 active [303,304]. NALP3 est la seule protéine de la famille des NLR ne contenant pas de domaine CARD. Cet assemblage de l'inflammasome NLRP3 ou NALP3 est lui-même dépendant de la stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP.

Ainsi, chez les souris déficientes pour le récepteur P2X7, les monocytes pré-stimulés par le LPS présentent un blocage de la sécrétion d'IL-1 β [305]. D'autre part, il a été montré qu'un efflux de potassium est requis dans la cascade d'activation et de sécrétion de l'IL-1 β dépendante du récepteur P2X7. Kahlenberg et coll ont montré qu'une brève stimulation de la lignée murine de macrophage Bac 1 par l'ATP ou la nigéricine, un ionophore à potassium, induit une activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β [306]. Deux mécanismes sont ainsi proposés pour expliquer l'implication de l'efflux de potassium dans l'activation de la caspase-1 :

1. L'interaction entre deux domaines CARD serait dépendante de la charge ionique. Or, la concentration en K⁺ intracellulaire, qui est de l'ordre de 130 mM, empêcherait cette interaction. Un efflux de potassium causant une diminution de la concentration en K⁺ intracellulaire permettrait l'assemblage des domaines CARD et l'activation de la caspase-1.
2. L'efflux de K⁺ stimulerait la PLA2 indépendante du Ca²⁺ (ou iPLA2). L'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme, le BEL (ou *bromoennolactone*), inhibe l'activation de la caspase-1 par l'ATP [306]. D'autre part, l'iPLA2 peut activer un second messenger lipidique qui activerait à son tour des protéines d'échafaudage de l'inflammasome comme la NALP-1.

En outre, il a été montré que la stimulation de macrophages par de l'ATP induit la libération à partir de la membrane plasmique de microvésicules contenant de l'IL-1 β sous forme active [307]. La libération des microvésicules s'accompagne d'une externalisation réversible de la PS qui est dépendante du calcium extracellulaire. Un autre groupe, a montré que la sécrétion d'IL-1 α et d'IL-1 β est dépendante du calcium intracellulaire sécrété à partir du réticulum endoplasmique et que l'IL-1 α peut aussi être sécrétée par une voie indépendante du récepteur P2X7 impliquant l'influx calcique du milieu extracellulaire [308] (*cf. Figure 9*).

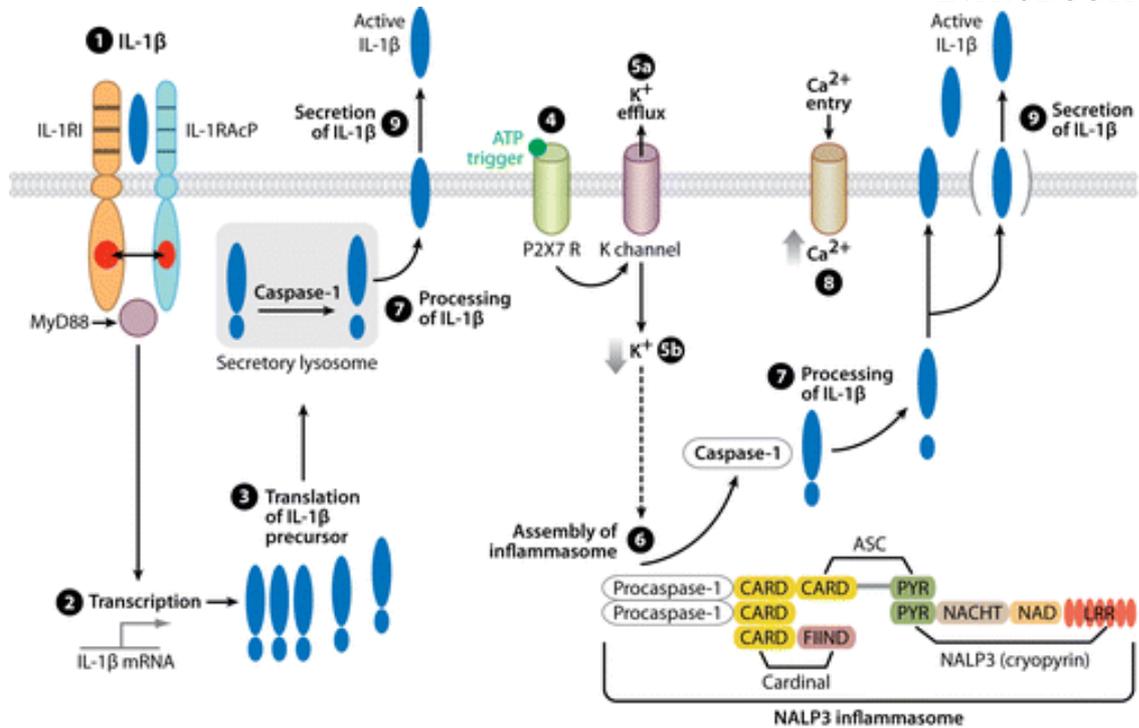


Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la sécrétion d'IL-1 β

1. L'activation du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) des monocytes ou des macrophages par l'IL-1 β induit le recrutement de l'adaptateur MyD88 ce qui stimule 2. la transcription du gène de l'IL-1 β et 3. la traduction de la pro-IL-1 β . L'activation des monocytes ou des macrophages induit la sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire ce qui 4. active le récepteur P2X7 et induit 5a. un efflux de potassium. 5b. La baisse de la concentration potassique dans le milieu intracellulaire constitue un second signal pour 6. l'assemblage de l'inflammasome ce qui active 7. la caspase-1 et par voie de conséquence 8. la maturation de l'IL-1 β par clivage protéolytique 9. Un influx de calcium dans la cellule facilite la sécrétion d'IL-1 β par exocytose [303].

L'implication du calcium dans l'activation et le clivage de l'IL-1 β a été remise en cause par d'autres études. Ainsi Pelegrin et coll ont montré que la sécrétion de la pro-IL-1 β dépendante du récepteur P2X7, mais pas de l'IL-1 β mature, par la lignée murine RAW264.7 n'exprimant pas ASC, se fait par un mécanisme différent de la caspase-1 et l'assemblage de l'inflammasome et aussi indépendamment du calcium extracellulaire et intracellulaire [301]. De plus, il a été proposé que la pannexine-1 puisse participer à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Pelegrin et coll, ont décrit deux mécanismes de sécrétion de l'IL-1 β : un premier mécanisme impliquant la caspase-1 et l'assemblage de l'inflammasome et qui est dépendant de la pannexine-1 et un deuxième mécanisme indépendant de la caspase-1 et de la pannexine-1. Ils ont montré que dans les macrophages péritonéaux, la sécrétion des IL-1 α/β et de l'IL-18 est dépendante du récepteur P2X7 et implique la pannexine-1 alors que la sécrétion de ces cytokines dans la lignée de macrophages RAW264.7 est indépendante de la pannexine-1 [301]. Cependant, l'implication de la pannexine-1 dans la sécrétion de l'IL-1 β a été contredite récemment, puisque la souris déficiente pour la pannexine présente une activation de la caspase-1 et une sécrétion normale d'IL-1 β après stimulation par l'ATP ou la nigericine, un ionophore à K $^{+}$. En revanche, l'incorporation du YO-PRO-1 est réduite au cours de l'apoptose stimulée par la dexaméthasone comparée aux souris sauvages [309].

Ces études ainsi que de nombreuses autres ont décrit les acteurs impliqués dans l'inflammasome et la maturation de l'IL-1 β . Quant à savoir comment cette cytokine est sécrétée dans le milieu extracellulaire, plusieurs hypothèses ont été suggérées : le clivage de la pro-IL-1 β par la caspase peut avoir lieu dans les lysosomes sécrétoires et donc la

sécrétion de cette cytokine peut avoir lieu après une exocytose à partir des lysosomes sécrétoires ou bien l'IL-1 β est sécrétée par libération de microvésicules membranaires ou même à travers des transporteurs membranaires [303]. D'autres travaux sont donc encore nécessaires pour d'éclaircir tous ses mécanismes.

D. Variants du récepteur P2X7

Plusieurs variants du récepteur P2X7 ont été décrits et pourraient contribuer, selon leur expression, à une diversité de réponses physiologiques et aussi à certaines pathologies. Ces variants, résultant d'épissage alternatif ou bien de mutations, présentent une expression différente selon l'espèce et le type cellulaire.

a. Isoformes du récepteur P2X7

Chez l'Homme, le récepteur P2X7 est localisé sur le chromosome 12 à la position 12q24. Des polymorphismes au niveau dans cette région ont été décrits comme associés à des troubles inflammatoires et psychiatriques. Neuf isoformes (B à J) générées par épissage alternatif du gène *p2x7* ont été décrites chez l'Homme en plus de la forme classique A qui comprend 13 exons. Ces isoformes sont le résultat de l'introduction d'un nouvel exon N3 ou bien de la délétion d'un ou plusieurs exons. Une seule isoforme a été décrite chez la souris K en plus de l'isoforme A (*cf* **Figure 10**).

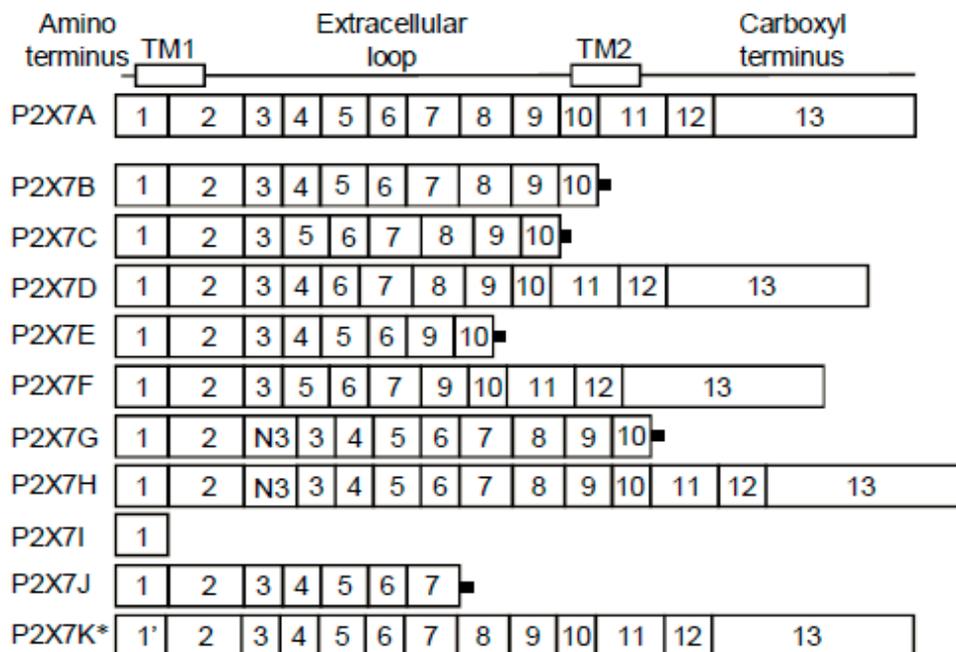


Figure 10 : Isoformes du récepteur P2X7 humain et murin

Les différents domaines (queue N-terminale, domaine TM1, boucle extracellulaire, domaine TM2 et queue C-terminale) de la forme complète du récepteur sont représentés schématiquement en haut de la figure. Le reste de la figure représente les différentes isoformes décrites alignées par rapport à l'isoforme classique A. Les exons N3 et 1' correspondent aux nouveaux exons retrouvés, respectivement, chez l'Homme et la souris. *A ce jour, l'isoforme K du récepteur P2X7 est exclusive aux rongeurs [310].

L'ARNm de l'isoforme B conserve l'intron situé entre les exons 10 et 11. Cet intron est responsable de l'introduction d'un codon stop prématuré ce qui entraîne la synthèse

d'une protéine tronquée au niveau des 171 derniers acides aminés de la queue C-terminale. L'isoforme B contient 18 nouveaux acides aminés au niveau du deuxième domaine transmembranaire ce qui permet à cette isoforme de conserver son ancrage membranaire. Les ARNm codant pour cette isoforme présentent une distribution similaire à celle de l'isoforme classique A notamment dans le système nerveux et le système immunitaire et plus particulièrement dans les lymphocytes du sang périphérique. Des expériences fonctionnelles dans un système hétérologue ont montré que l'isoforme B est capable de former le canal ionique mais pas le pore. De plus, une accumulation du Ca^{2+} est observée dans le réticulum endoplasmique en présence de l'isoforme B ce qui entraîne une activation du facteur de transcription NFAT et une prolifération cellulaire qui, selon les auteurs de ce travail, pourraient être impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses. De façon surprenante, il a été montré que l'hétérodimère formé par les deux isoformes A et B présente une activité pore plus forte que celle due à l'isoforme A seule [311].

De plus, les isoformes C, D, E et F de P2X7 sont dépourvues de certains exons qui codent pour une partie de la boucle extracellulaire (*cf* **Figure 10**). Les isoformes C, E, G et J de P2X7, tout comme l'isoforme B, contiennent le même intron entre les exons 10 et 11 et ont donc perdu une partie de l'extrémité C-terminale ce qui altère l'activité pore du récepteur et l'activation de l'apoptose [312].

Les isoformes G et H contiennent, entre les exons 2 et 3, un nouvel exon, appelé N3, ce qui génère un nouveau codon responsable de la traduction d'une protéine P2X7 ne présentant pas le premier domaine transmembranaire. Cependant, l'isoforme H semble être non fonctionnelle et est exprimée en très faible quantité [312]. Le récepteur P2X7 I est le résultat d'une mutation ponctuelle rare (rs35933842; g151+1 > t) dans l'intron entre les exons 1 et 2 causant un allèle nul. L'isoforme I pourrait être responsable d'une augmentation de la susceptibilité aux infections par *Mycobacterium tuberculosis*. Dans le cas du polymorphisme Glu496Ala (rs35933842), les macrophages des patients infectés par des mycobactéries présentent une mort induite *ex-vivo* par l'ATP totalement inhibée. L'absence de l'exon 8 dans l'isoforme J entraîne la production d'une protéine tronquée pour toute la partie C-terminale intracellulaire, le domaine TM2 et une partie de la boucle extracellulaire. Bien qu'elle ait été initialement décrite dans les cellules cancéreuses cervicales humaines, un taux équivalent d'ARNm codant l'isoforme J est retrouvé dans les cellules cervicales d'individus normaux. Non seulement l'isoforme J n'est pas fonctionnelle mais en plus elle bloque l'activité de l'isoforme classique A en formant avec elle un hétérodimère inactif. Cette étude suggère que l'isoforme J protège les tissus cancéreux de l'apoptose induite par l'ATP [313].

Chez la souris et le rat, seule l'isoforme K du récepteur P2X7 a été décrite. Dans cette isoforme, l'exon 1 codant l'extrémité N-terminale et le domaine TM1 est remplacé par un nouvel exon 1' qui apporte un nouveau codon d'initiation de la traduction [314]. La découverte de cette isoforme a été rendue possible grâce à la construction, par les laboratoires Pfizer et GlaxoSmithKline (GSK), de deux lignées de souris génétiquement déficientes pour le récepteur P2X7 afin d'étudier la physiologie du récepteur P2X7. Dans la lignée de souris générée par les laboratoires Pfizer [305], une cassette néomycine a été insérée au niveau de l'exon 13 afin de produire un récepteur tronqué dans la région qui code pour la queue C-terminale. Alors que dans la souris produite par les laboratoires GSK [315], le gène *p2x7* a été inactivé par l'insertion dans l'exon 1 d'un transgène *lacZ*.

INTRODUCTION

Dans la souris produite par les laboratoires GSK, alors que le récepteur P2X7 est bien absent dans les macrophages péritonéaux, les leucocytes, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules canaliculaires sous-maxillaires, son expression est conservée dans le cerveau suggérant l'existence d'une isoforme du récepteur P2X7 non encore identifiée à l'époque [316](cf. **Figure 11**). L'analyse fonctionnelle a montré que cette nouvelle isoforme est six fois plus sensible au BzATP qu'à l'ATP (EC_{50} 87 μ M vs 590 μ M) avec une moindre sensibilité à l'ouverture du canal Ca^{2+} [317], une désensibilisation plus lente et une meilleure capacité à former le pore cationique [318]. La souris produite par GSK constitue donc un outil intéressant pour étudier l'isoforme K.

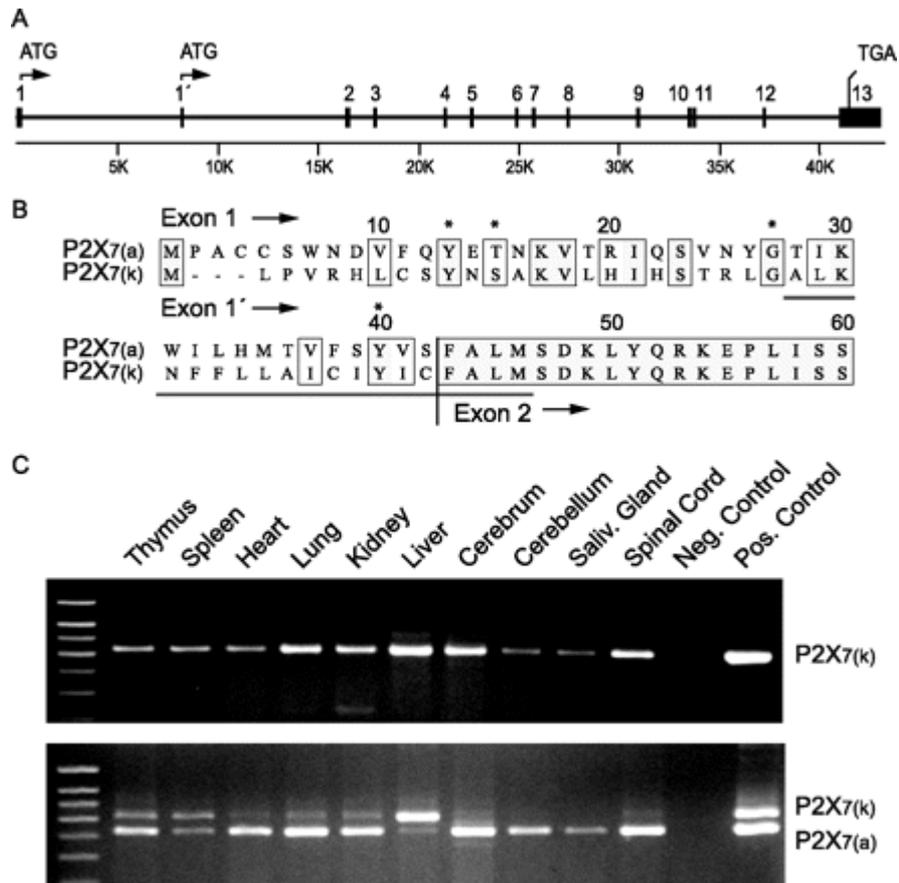


Figure 11 : Structure du gène et séquence en acides aminés du variant K du récepteur P2X7 ainsi que les taux d'ARNm présents dans les tissus

A. Structure génomique du gène *p2x7* indiquant la position du nouvel exon 1' ainsi que les autres exons du gène. La figure présente la position des codons d'initiation de la traduction des isoformes A et K ainsi que le codon stop commun aux deux isoformes. **B.** Alignement des séquences en acides aminés des deux isoformes. Les résidus conservés entre les exons 1 et 1' sont encadrés par des boîtes. Les astérisques indiquent les résidus conservés dans tous les récepteurs P2X. La partie de la séquence qui est soulignée code pour le domaine TM1. **C.** Gel d'agarose présentant les taux d'expression en ARNm des isoformes A et K dans différents organes de souris analysés par RT-PCR [318].

D'autre part, l'isoforme K est sensible à l'activation par le NAD alors que l'isoforme classique A est résistante. Cette résistance à l'activation par le NAD semble être due à une mutation ponctuelle (R276K) [314]. La même étude a aussi montré que les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes Trég expriment de préférence le récepteur P2X7 K alors que les macrophages expriment majoritairement l'isoforme A. Cela suggère que l'épissage alternatif du gène *p2X7* est impliqué dans une modulation de la sensibilité des lymphocytes T à la stimulation par le NAD [314].

D'autres isoformes tronquées au niveau C-terminal ont récemment été décrites [319]. Leur découverte remet en question certaines des conclusions tirées à partir des résultats obtenus avec la souris déficiente pour le récepteur P2X7 produite par les laboratoires Pfizer. Ces deux nouveaux variants 13B et 13C, sont issus d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 13 du gène *p2x7* qui donne lieu à un récepteur tronquée dans la queue C-terminal soit à la position 430 (P2X7 13B) ou après la position 430 au niveau d'une séquence alternative de 11 acides aminés (P2X7 13C). L'isoforme 13B a été détectée dans tous les tissus mais avec une forte expression dans le cerveau, les glandes salivaires et la rate alors que l'isoforme 13C a été retrouvée exclusivement dans le cerveau, les poumons et les glandes salivaires. De plus, la transfection de la lignée HEK-293 par ces deux isoformes montre une faible expression en comparaison de la forme classique qui est due à une faible efficacité de trafic du RE vers la membrane plasmique. D'autre part, la coexpression de ces isoformes avec la forme classique A montre que l'isoforme 13B agit comme un régulateur négatif de la forme classique du récepteur P2X7. Au niveau fonctionnel, ces deux isoformes présentent une réduction de l'activité canal comparé à l'isoforme classique A [319]. Cette étude montre donc que la souris générée par les laboratoires Pfizer n'est pas totalement déficiente pour le récepteur P2X7 mais possède des isoformes du récepteur présentant une très faible activation.

b. Polymorphismes du récepteur P2X7

Plusieurs études ont mis en évidence un grand polymorphisme dans le gène du récepteur P2X7 chez l'Homme et à un moindre niveau chez la souris. Ces polymorphismes sont responsables de réponses différentes à l'ATP et ont été parfois associés à des maladies.

Le travail d'Adriouch et coll a montré qu'il existe un polymorphisme dans le gène codant pour le récepteur P2X7 chez la souris B6 au niveau du domaine C-terminal dans lequel la proline en position 451 chez BALB/c a été substituée par une leucine P451L chez B6 (P451L). Ainsi, les lymphocytes T issus de souris B6 sont moins sensibles à la formation du pore et à l'externalisation de la PS induites par l'ATP que ceux des souris BALB/c. D'autres souris de laboratoires portant la même mutation P451L, notamment DBA/1 et DBA/2, présentent une activité réduite en réponse à l'activation du récepteur P2X7 [258]. D'une façon intéressante, le même travail a décrit que des lignées HEK-293 transfectées par les deux variants présentent le même taux d'expression bien que présentant une sensibilité différente à l'ATP suggérant que la réponse du récepteur P2X7 est dissociée de son taux d'expression. D'autre part, un autre groupe a montré que l'activation de la phospholipase D par le récepteur P2X7, mais pas la mort des thymocytes, était la même dans les deux souches de souris B6 et BALB/c suggérant que contrairement à la mort cellulaire, l'activation de la phospholipase D est indépendante de la mutation P451L [284]. Une étude récente a montré que la P451 est aussi responsable d'une allodynie, un symptôme de douleur chronique déclenchée par un stimulus qui normalement est indolore. De plus l'administration à des souris A/J, qui ont la forme la plus sensible du récepteur P2X7 (P451), de peptides correspondants au domaine C-terminal du récepteur P2X7 (sous la forme P451) fusionnés avec la protéine TAT du virus VIH, inhibe de façon

spécifique le développement de l'allodynie ainsi que la formation du pore mais pas le canal cationique [320]. D'autre part, une étude récente a rapporté que les lignées de souris BALB/c et 129X/2J exprimant le variant P451 du récepteur P2X7 présentent des fémurs plus forts ainsi que des taux élevés en télépeptides C-terminal du collagène de type I, un marqueur de la résorption osseuse, que les souris B6 et DBA/2J exprimant le variant L451 suggérant que la régulation de la résorption osseuse semble avoir un lien avec l'activité pore du récepteur P2X7 [321].

Quant au récepteur P2X7 humain, bien qu'il soit hautement polymorphe, la plupart des mutations sont des mutations non sens [201, Caseley, 2014 #2797]. Un très petit nombre de mutations dans le gène *p2x7* humain ont été étudiés au niveau fonctionnel. Une mutation gain de fonction (Q460R) au niveau de la queue C-terminale a été décrite associée à plusieurs maladies comme le trouble bipolaire, la dépression et le syndrome de Sjögren [201]. De plus, une autre mutation (E496A) de la queue C-terminale est responsable de la résistance des lymphocytes B à l'apoptose induite par l'ATP extracellulaire corrélée à la gravité de la LLC [284]. En accord avec l'étude présentée dans le paragraphe précédent sur le rôle de P2X7 dans le développement de l'allodynie chez la souris, des études d'association pan-génomique ont montré qu'il existe une association génétique entre des polymorphismes dans le gène codant le récepteur P2X7 et la présence de douleurs chroniques [320]. Plusieurs mutations perte de fonction de P2X7 (G150R, R307Q, E496A, et I568N) ont été identifiées comme corrélées avec l'ostéoporose et des fractures notamment chez des patientes en post-ménopause. En revanche la mutation de gain de fonction A348T de P2X7 est associée avec une augmentation de la densité minérale osseuse et d'une moindre incidence de fractures [322].

En résumé, la caractérisation fonctionnelle des différentes isoformes du récepteur P2X7 ainsi que l'association entre les mutations du récepteur et le développement de certaines maladies offrent une meilleure compréhension du récepteur P2X7 et démontrent, s'il en était encore besoin, l'importance de ce récepteur comme cible thérapeutique. Cependant, des études fonctionnelles des mutations seront encore nécessaires pour mieux caractériser les mécanismes cellulaires et les acteurs responsables de ces maladies.

E. Le récepteur P2X7 est-il capable de former des hétérodimères ?

Pendant longtemps, il a été admis que le récepteur P2X7 n'était pas capable de former des hétéromères. Des études récentes ont cependant rapporté une possible association entre les récepteurs P2X4 et P2X7. En effet, les gènes codant pour les récepteurs P2X4 et P2X7 présentent une liaison génétique quasi totale, une grande homologie de séquence et sont exprimés par les mêmes types de cellules : épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques [137,323]. Il a d'ailleurs été suggéré que les deux gènes P2X4 et P2X7 proviendraient d'une duplication génique. Une association entre les deux récepteurs P2X4 et de P2X7 a été mise en évidence par des expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans la lignée HEK-293, chez le xénope ainsi qu'avec des macrophages dérivés de la moelle osseuse [163, Saul, 2013 #1277]. Cependant, d'autres études réalisées sur du tissu natif de moelle osseuse, de ganglions lymphatiques ou de glandes salivaires ont échoué à mettre en évidence ces complexes hétérotrimériques [324]. En effet, des expériences de BN-PAGE (ou *blue native polyacrylamide gel*

electrophoresis), réalisées sur des cultures primaires de macrophages de rat et des microglies de souris, ont mis en évidence une interaction entre les complexes homotrimériques de P2X7 et de P2X4 suggérant une association entre les complexes plutôt qu'entre les récepteurs [179]. De plus, cette même étude a révélé que les récepteurs P2X4 sont majoritairement intracellulaires alors que les récepteurs P2X7 sont membranaires. Une étude plus récente, utilisant la microscopie à force atomique a confirmé la formation de complexes entre les récepteurs P2X2 et P2X4 d'une part et P2X4 et P2X7 d'autre part. Ces complexes colocalisent dans la lignée HEK-293 transfectée [325]. Un autre argument en faveur de l'existence d'association entre les récepteurs P2X4 et P2X7 est que la délétion génétique de l'un des deux récepteurs affectent le taux en ARNm de l'autre récepteur [200]. Des études fonctionnelles présentent aussi des arguments solides sur la possible association entre les deux récepteurs P2X4 et P2X7. Ainsi, il a été montré que, dans la lignée de macrophages murins RAW246.7, une réduction de l'expression du récepteur P2X4 par des shRNA (*cf page 42*) inhibe la mort cellulaire et la sécrétion d'IL-1 β [324,326]. En revanche, la formation de pore et l'activation de la MAK induits par l'ATP ne sont pas affectées.

Bien que les expériences de co-immunoprécipitation constituent une preuve d'une interaction physique entre deux protéines, elles ne permettent pas de déterminer s'il s'agit d'une association entre deux complexes homotrimères ou des hétérotrimères formés par les récepteurs P2X7 et P2X4. D'autre part, il est encore difficile d'exclure un artefact dû à l'agrégation des protéines au cours du processus de solubilisation et de purification ou bien à leur surexpression en vue de leur purification. De plus, il est important de noter que même dans les expériences réalisées avec des tissus natifs, le choix des anticorps utilisés constitue un critère de spécificité à considérer [324]. En résumé, d'autres méthodes de détection de ces interactions sont nécessaires afin de confirmer les études présentées ci-dessus.

5. P2X7 dans le système immunitaire

La majorité des cellules immunitaires expriment différents types de récepteurs P2X ce qui suggère une régulation des fonctions immunitaires par la signalisation purinergique (*cf. tableau 5*). Comme nous l'avons vu précédemment, l'ATP est un signal de danger endogène pour le système immunitaire et il joue un rôle important, dans la maturation et la sécrétion de cytokines inflammatoires ou encore l'activation de métalloprotéases responsables du clivage de récepteurs de membrane comme la molécule de homing CD62L. De façon plus général, le récepteur P2X7 est impliqué dans de nombreux processus immunophysiologiques comme l'activation cellulaire, l'inflammation ou encore la mort cellulaire.

Tableau 5 : Sous-types de récepteurs P2X et leur distribution sur les cellules immunitaires [137,327]

Récepteurs P2X	Distribution chromosomique	Distribution sur les cellules immunitaires
P2X1	17(17p13.3)	Neutrophiles, monocytes, macrophages, DC, lymphocytes T, NK
P2X2	12(12q24.33)	
P2X3	11(11q12)	
P2X4	12(12q24.32)	
P2X5	17(17p13.3)	Neutrophiles, monocytes, macrophages, DC, lymphocytes T
P2X6	22(22q11.21)	
P2X7	12(12q24)	Neutrophiles, monocytes, macrophages, DC, lymphocytes T et B, NK

La signalisation du récepteur P2X7 dans les cellules immunitaires semble être complexe du fait de la variation de la concentration en ATP extracellulaire, la modulation de l'expression du récepteur P2X7 sur les cellules immunitaires et la multitude d'activité induite par ce récepteur au cours des processus physiopathologiques du système immunitaire.

A. P2X7 et immunité inné

Les mastocytes, qui sont des effecteurs bien connus des maladies inflammatoires et allergiques, ont été les premières cellules du système immunitaire décrites comme étant sensible à l'ATP [137,194]. Le récepteur P2X7 des mastocytes joue également un rôle dans l'inflammation intestinale. Ainsi, le colon des souris ayant une colite et des patients atteints de la maladie de Crohn présentent un nombre élevé de mastocytes exprimant le récepteur P2X7. Le traitement de ces souris par un anticorps bloquant le récepteur P2X7 réduit l'activation des mastocytes et par voie de conséquence l'inflammation intestinale. De même, une moindre susceptibilité à l'inflammation intestinale est retrouvée après transfert de mastocytes de souris déficientes pour le récepteur P2X7, mais pas de souris sauvages, à des souris génétiquement dépourvus en mastocytes [328]. Le même groupe a montré récemment que les mastocytes de la peau, contrairement aux mastocytes de l'intestin, sont réfractaires à une activation par l'ATP en raison d'une très faible expression du récepteur P2X7. Le transfert de mastocytes dérivés de la moelle osseuse dans la peau de souris déficientes en mastocytes a montré que la peau contient des facteurs qui inhibent l'expression du récepteur P2X7 des mastocytes transférés. Cette inhibition de l'expression du récepteur P2X7 est dépendante des fibroblastes de la peau qui sécrètent des enzymes dégradant l'acide rétinoïque qui est connue pour induire l'expression du récepteur P2X7 [329].

Les neutrophiles sont des effecteurs essentiels de l'immunité innée. Les neutrophiles sont capables de reconnaître et phagocyter les microbes ainsi que les produits bactériens et les particules opsonisées par les anticorps. La destruction des pathogènes par les neutrophiles est une étape importante de la réponse inflammatoire. Bien que des ARNm ainsi qu'un pool intracellulaire de récepteurs P2X7 aient été détectés dans les neutrophiles humains, l'expression à la membrane d'un récepteur fonctionnel reste controversée. L'expression membranaire du récepteur P2X7 observée dans d'autres types cellulaires lors d'une inflammation [330] suggère qu'une telle expression est concevable dans le cas des

neutrophiles [327]. Cependant, des expériences récentes d'électrophysiologie réalisées sur la lignée de neutrophile humain HL-60 ainsi que sur des neutrophiles humains normaux indiquent que ces cellules n'expriment pas le récepteur P2X7 et ne présentent pas les activités induites par ce récepteur comme la formation du pore ionique, la production des ROS, le clivage de CD62L ou encore la mort cellulaire [331].

Les macrophages tissulaires ou résidents jouent un rôle critique dans l'initiation, le maintien et la résolution de la réponse immunitaire innée de type inflammatoire. Ils ont au cours de l'inflammation trois fonctions principales : production de cytokines et facteurs de croissance, phagocytose et présentation antigénique. D'autre part, alors que les neutrophiles sont les principaux effecteurs de l'inflammation aiguë, ce rôle est joué par les monocytes/macrophages en cas d'inflammation chronique. Une modulation de l'expression du récepteur P2X7 est observée au niveau des monocytes circulants et des macrophages tissulaires du site inflammatoire. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IFN- γ ainsi que les endotoxines bactériennes de type LPS induisent une forte expression de ce récepteur. A l'inverse, une diminution de l'expression du récepteur P2X7 a lieu dans les monocytes et les macrophages en réponse aux cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 [327]. La signalisation du récepteur P2X7 est également impliquée dans l'élimination des parasites et les bactéries. Ainsi, le prétraitement des macrophages et des monocytes par le LPS et l'IFN- γ augmente l'activation de la PLD, la perméabilité de la membrane plasmique ou la lyse cellulaire, induites par l'activation du récepteur P2X7 [330]. De plus, et comme mentionné à plusieurs reprises, la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 nécessite l'activation du récepteur P2X7 des macrophages [332]. Le récepteur P2X7 est aussi impliqué dans le processus de fusion cellulaire qui conduit à la formation de macrophages (ou histiocytes) géants multinucléés au cours des réponses inflammatoires chroniques. Ce processus semble être une étape importante pour contrôler la tuberculose chez l'Homme puisque des mutations perte de fonction affectant le gène codant *p2x7* sont associées à une augmentation de la susceptibilité à la tuberculose ou à la toxoplasmose [332]. D'autres études se sont intéressées au rôle du récepteur P2X7 dans l'élimination de microbes intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci*, *Leishmania amazonensis* ou *Toxoplasma gondii*. Cette élimination peut-être directe en inhibant l'infection par l'activation de la PLD et par conséquent la formation du phagolysosome et la sécrétion des ROS ou indirecte en induisant la maturation et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 ou la mort du macrophage infecté [332]. De leur côté, les microbes intracellulaires ont aussi développé des mécanismes pour manipuler le système purinergique et s'échapper à la réaction immunitaire [332]. Ainsi, l'activité pore induite par le récepteur P2X7 pourrait être affectée dans les macrophages après leur infection par *Leishmania Amazonensis*. Ce parasite augmente la perméabilité aux sondes anioniques et réduit la perméabilité aux sondes cationiques ce qui pourrait être, pour le parasite, un moyen d'échapper à la réponse immunitaire ou bien d'apporter des nutriments du milieu extérieur [333]. D'autres études sont nécessaires pour comprendre le mécanisme mis en jeu et son utilité pour la bactérie. Ces résultats suggèrent que la formation du pore P2X7 peut être régulée lors des réponses immunitaires. De même, le rôle du récepteur P2X7 a été décrit dans l'élimination de *Toxoplasma gondii* des macrophages murins et humains par un mécanisme impliquant la

production des ROS qui à son tour activerait l'inflammasome et par voie de conséquence la maturation et la sécrétion d'IL-1 β [332] (*cf.* **Figure 12**).

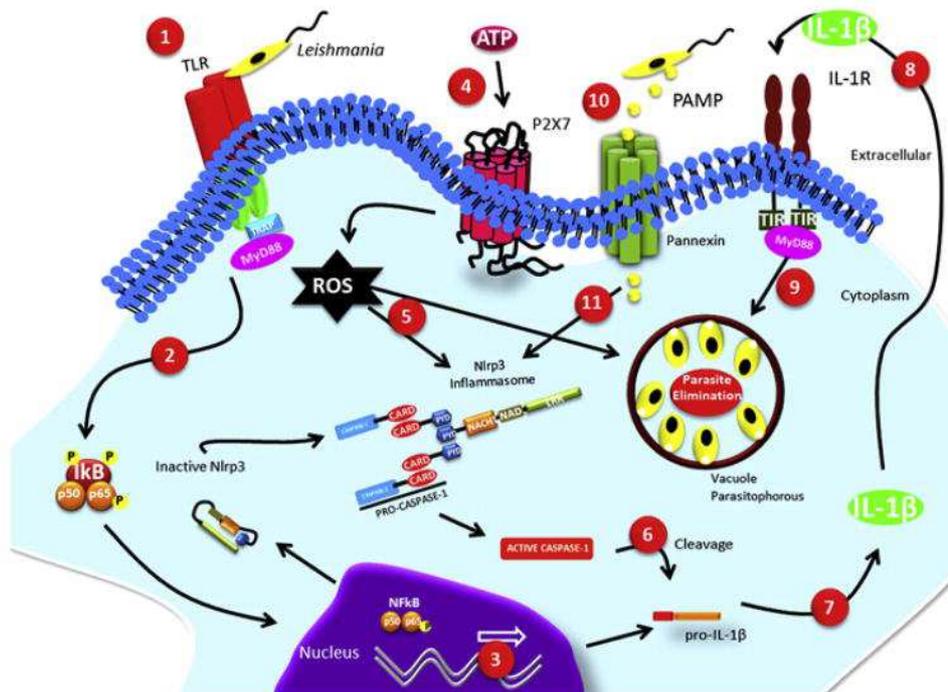


Figure 12 : Mécanisme d'élimination des parasites intracellulaires induit par le récepteur P2X7.

1. La fixation du parasite à un TLR active une cascade de signalisation conduisant à 2. la phosphorylation d'Ik β et donc sa dégradation ce qui permet la translocation de NF κ B au noyau et 3. l'expression de l'IL-1 β . 4. Un deuxième stimulus est donné par l'ATP à travers le récepteur P2X7 qui induit la production des ROS qui 5. stimule directement l'élimination du parasite et active l'inflammasome qui par voie de conséquence 6. active la maturation de la pro-IL-1 β et 7. la sécrétion de l'IL-1 β qui 8. et 9. agit sur son récepteur. 10. De plus, les antigènes libérés (PAMPs) par les parasites peuvent entrer dans la cellule suite à la formation d'un pore de type pannexine activée par l'ATP extracellulaire qui 11. active de nouveau l'inflammasome [332].

Les cellules de la microglie sont des macrophages résidents du système nerveux central et qui en tant que tel produisent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, IL-18 et le TNF- α , en réponse à une stimulation du récepteur P2X7 [334].

B. P2X7 et immunité humorale et adaptative

Les DC sont les cellules présentatrices d'antigène les plus efficaces d'où leur nom de cellules présentatrices professionnelles. Ce sont les seules cellules capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Elles sont présentes dans les tissus périphériques sous forme de cellules immatures. Les DC immatures disposent de très grandes capacités à reconnaître et à capturer l'antigène. Différents mécanismes peuvent être utilisés par les DC pour capturer les antigènes : endocytose, phagocytose ou pinocytose. Les antigènes solubles sont captés par micropinocytose ou macropinocytose. Les DC sont également infectables par certains virus comme le VIH. Une fois qu'elles ont capturé l'antigène elles commencent leur maturation tout en migrant vers les organes lymphoïdes où elles présenteront des peptides de l'antigène aux lymphocytes T CD4 et CD8 afin d'induire leur activation.

INTRODUCTION

La réponse des DC diffère selon le type d'exposition à l'ATP. Une exposition aiguë à l'ATP (0,5 à 1 mM) en association avec le signal induit par le LPS entraîne, comme déjà mentionné, la maturation et la sécrétion d'IL-1 β et la production de cytokines pro-inflammatoires [335]. Une stimulation prolongée (de 15 à 30 min) par des concentrations millimolaires d'ATP cause un changement morphologique des DC murins et humains et induit leur apoptose suite à l'activation des caspases-1 et -3. La caspase-1 peut dans certaines situations induire une forme d'apoptose des macrophages (appelée pyroptose) en réponse à une infection par des bactéries intracellulaire et suite à la stimulation du récepteur de mort Fas [278,336]. Cependant, un signal chronique de stimulation par l'ATP (10 à 250 μ M) entraîne la maturation des DC et stimule leur capacité à induire une réponse de type Th2 accompagnée d'une augmentation de l'expression des marqueurs de co-stimulation B7-1 (ou CD80) et B7-2 (ou CD86). Si ce signal chronique causé par l'ATP est accompagné par un autre signal de type LPS ou CD40L, l'expression et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-6 et IL-12 sont inhibées alors que la sécrétion de la protéine antagoniste de l'IL-1R et l'IL-10 n'est pas affectée. Par voie de conséquence, la coculture de ces DC et des lymphocytes T naïfs conduit à une polarisation de type Th2 [335]. Donc la capacité des DC à induire les réponses de type Th1 ou Th2 dépend à la fois de la concentration en ATP, de la durée de la stimulation ainsi que du signal associé. Le récepteur P2X7 est également impliqué dans la polarisation des lymphocytes T au cours d'allergie comme par exemple dans l'hypersensibilité retardée ou de contact (lymphocytes T CD8⁺), l'asthme (lymphocytes T CD4⁺ de type Th2) et lors de la transplantation (lymphocytes T CD4⁺ de type Th1) [111]. L'ATP est impliquée aussi dans la régulation de l'expression des récepteurs aux chimiokines qu'elles sécrètent, comme le CCL2 ce qui affecte leur circulation depuis les tissus endommagés vers les organes lymphoïdes et depuis le sang vers les tissus et cause un recrutement des lymphocytes T CD4⁺ de type Th2 [335].

Lors de la maladie du greffon contre l'hôte (ou *graft-versus-host disease* GVHD) des concentrations élevées d'ATP sont retrouvées dans le liquide péritonéal des receveurs, aussi bien chez les humains que dans les modèles murins, associées à une hyper-réponse des DC à l'ATP ainsi qu'à une production accrue d'IFN- γ et à l'expansion *in vitro* et *in vivo* des lymphocytes T provenant du donneur. Le blocage pharmacologique ou génétique du récepteur P2X7 au cours de la GVHD augmente la survie sans porter atteinte à la réponse immunitaire suggérant une stratégie thérapeutique prometteuse [337].

Les lymphocytes B sont des acteurs de l'immunité humorale par la production des anticorps qui neutralisent et éliminent les pathogènes extracellulaires. Deux sous-populations de lymphocytes B existent, les lymphocytes B conventionnels appelés aussi B-2 de phénotype CD5⁻ qui sont des médiateurs de l'immunité adaptative. Ils sont localisés dans la zone folliculaire des organes lymphoïdes où ils interagissent avec les lymphocytes T CD4⁺ ce qui induit la commutation isotypique et la maturation d'affinité du récepteur d'antigène par mutation somatique. Les lymphocytes B-1 CD5⁺ sont considérés comme des acteurs de l'immunité innée, leur activation est indépendante des lymphocytes T (thymo-indépendants) et sont activés par des antigènes à motifs répétés comme le LPS ou le polysaccharide de pneumocoque. Le récepteur P2X7 est exprimé aussi bien à la surface des lymphocytes B-1 que B-2 et induit un influx calcique, la formation du pore ainsi que

l'apoptose en réponse à l'ATP. Une accumulation de la sous-population de lymphocytes B-1 a été décrite dans le sang et la moelle osseuse de patients souffrant d'une LLC [327]. Une mutation perte de fonction (A1513C) dans le gène *p2x7* entraîne une résistance à l'apoptose induite par le récepteur P2X7 ce qui expliquerait l'accumulation des lymphocytes de type B1 au cours de la LLC [338]. Cependant, une surexpression du récepteur P2X7 est aussi décrite dans la LLC accompagnée d'une réduction de la transmigration des lymphocytes à cause du clivage massif des molécules CD62L. Ainsi, et comme mentionné au paragraphe 4C d, de grandes concentrations de molécules CD62L et CD23 solubles ont été retrouvées dans le sérum des patients souffrant de LLC [327]. D'autre part, il a récemment été montré que les lymphocytes B ont une grande capacité à hydrolyser l'ATP du fait qu'ils expriment fortement la molécule CD39 qui d'ailleurs constitue un marqueur d'activation des lymphocytes B activés [327]. Une autre étude a montré que les lymphocytes B issus de sang périphérique humain hydrolysent l'ATP extracellulaire en présence d'un milieu riche en glucose 25 mM. De plus, la stimulation des lymphocytes B par la protéine de *Staphylococcus aureus* Cowan I ou SAC₇ de l'IL-2 et du BzATP induit la forte production d'IgM qui est bloquée par un antagoniste sélectif du récepteur P2X7 ainsi que des fortes doses de glucose. Cela suggère que de forte concentration en glucose inhibe la sécrétion d'IgM par les lymphocytes B induite par le récepteur P2X7 et pourrait expliquer la grande susceptibilité des patients diabétiques aux infections bactériennes [339].

Les lymphocytes T CD4⁺ *helper* (Th) et CD8⁺ cytotoxique sont les médiateurs de l'immunité cellulaire. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes intracellulaires grâce aux molécules d'histocompatibilité. Les lymphocytes Th reconnaissent des peptides de l'antigène présentés par les molécules de classe II du CMH exprimées par les APC alors que les lymphocytes T CD8 reconnaissent des peptides de l'antigène présentés par les molécules de classe I du CMH (CMH I) exprimés par les cellules nucléées de l'organisme. Les lymphocytes Th orchestrent la réponse immunitaire grâce à l'expression du ligand du récepteur CD40 (CD40L) et en secrétant différents types de cytokines. L'interaction entre la molécule CD40L, induite sur les lymphocytes Th lors de leur activation par l'antigène, et la molécule CD40, exprimée constitutivement par les lymphocytes B, les macrophages et les DC, est responsable, par exemple, de la commutation isotypique des immunoglobulines des lymphocytes B ou de la réactivation des macrophages inflammatoires. La classe d'anticorps produite dépendra du type de cytokines secrété par le lymphocyte Th lors de l'interaction CD40/CD40L. En effet, sur la base des cytokines qu'ils produisent, les lymphocytes Th sont divisés en deux sous-types majeurs : Th1 et Th2. Les Th1 produisent de l'IFN- γ et du TNF- α alors que les Th2 produisent les interleukines 4, 5 et 13. Un troisième type a été découvert plus récemment, il s'agit des lymphocytes Th17 qui produisent de l'IL-17. L'intensité et la durée du signal émis par l'interaction TCR-CMH2, le type d'APC, l'interaction entre les molécules de costimulation et leurs ligands ainsi que les cytokines présentes dans l'environnement déterminent le type de réponse Th. Le phénotype Th1 est engagé suite à la production d'IL-12 par les macrophages inflammatoires ou les DC activés, ou encore la production d'IFN- γ par les NK et les lymphocytes Th1 eux-mêmes ce qui entraîne l'activation des facteurs de transcription STAT-1 et STAT-4 qui à leurs tours activent l'expression du facteur de transcription T-bet et donc la production d'IFN- γ . Quant aux lymphocytes Th2, ils sont

INTRODUCTION

induits en cas d'infections parasitaires suite à la production d'IL-4 par les lymphocytes NKT, les mastocytes et les lymphocytes Th2 eux-mêmes ce qui entraîne l'activation du facteur de transcription STAT-6 qui à son tour induit l'expression du facteur de transcription GATA-3 et donc la sécrétion des cytokines de type Th2 responsables de la commutation de classe vers les classes d'anticorps, IgE ou IgG1, impliquées dans l'élimination des parasites par les polynucléaires éosinophiles et basophiles.

Les lymphocytes T cytotoxiques tuent les cellules infectées par des mécanismes d'apoptose impliquant l'exocytose de granules cytotoxiques (perforine et granzyme) et l'expression membranaire du ligand (FasL) du récepteur d'apoptose Fas.

Après leur maturation dans le thymus, les lymphocytes T matures naïfs migrent vers les organes lymphoïdes à travers les HEV (ou *high endothelial venules*). Ils expriment constitutivement le récepteur de basse affinité pour l'IL-2 composé des deux chaînes γ_c et β . Les lymphocytes T matures naïfs, après avoir rencontré leur antigène présenté par les CMH des APC (1^{er} signal d'activation) et reçu un deuxième signal d'activation par les molécules de costimulation, expriment les récepteurs de haute affinité pour l'IL-2. Les molécules de costimulation CD28 sont exprimées constitutivement par les lymphocytes T alors que les molécules CD80 ou CD86 sont exprimés transitoirement sur les APC ayant capturé un antigène. De plus, l'interaction CD40-CD40L induit une augmentation de l'expression de la molécule CD80 sur les APC. Au cours de leur activation, les lymphocytes T subissent une intense phase d'expansion clonale grâce à la synthèse, de leur facteur de croissance, l'IL-2, et à l'expression de la chaîne α ou CD25 du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. A la fin de cette phase de prolifération qui dure plusieurs jours, les lymphocytes T CD4 ou CD8 se différencient en cellules effectrices. Du fait de cette intense phase d'expansion clonale, qui concerne d'ailleurs également les lymphocytes B, il sera nécessaire, en fin de réponse immunitaire, d'éliminer par apoptose les lymphocytes T effecteurs, à l'exception des lymphocytes T mémoires, afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Les lymphocytes T mémoires permettront d'éliminer le même antigène rencontré une deuxième fois. La réponse secondaire se caractérise par une rapidité de déclenchement puisque l'activation secondaire des lymphocytes ne nécessite pas les molécules de co-stimulation et aussi par une plus grande capacité proliférative des lymphocytes T qui d'autre part expriment déjà les molécules caractéristiques des lymphocytes T activés. Deux voies d'apoptose distinctes sont impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes T effecteurs : la voie d'apoptose intrinsèque dépendante de Bim qui intervient dans l'élimination des effecteurs produits lors de la réponse primaire et la voie extrinsèque des récepteurs de mort, en particulier le récepteur Fas, qui intervient dans l'élimination des effecteurs produits lors de la réponse secondaire.

La différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices peut être suivie par la modulation de l'expression, au cours du temps, de différents marqueurs d'activation qui sont : CD69, CD45RB (RA chez l'Homme), CD44 et CD45RABC (ou B220).

a) La molécule CD69

La molécule CD69, encore connue sous le nom de marqueur d'activation précoce ou *very early activation marker*, peut être exprimée sur toutes les cellules dérivées de la moelle osseuse à l'exception des érythrocytes. Il s'agit d'un récepteur de la superfamille des lectines de type C. Le gène codant pour la molécule CD69 est localisé dans le cluster de gènes codant pour les récepteurs des cellules NK. La molécule CD69 est un homodimère formé de deux chaînes polypeptidiques présentant différents degrés de glycosylation et qui sont liées entre elles par un pont dissulfure (*cf.* **Figure 13**).

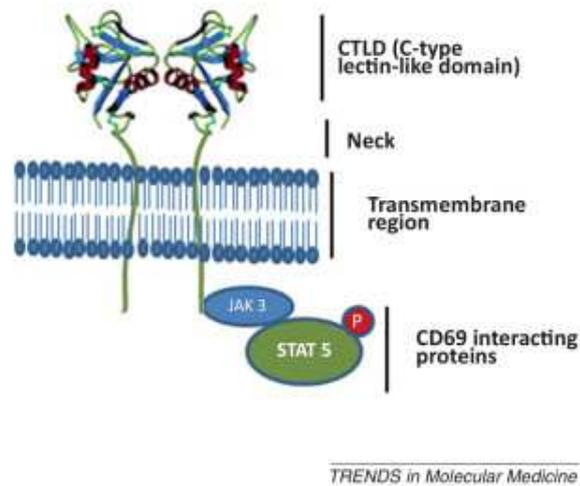


Figure 13 : Structure tridimensionnelle de la molécule CD69.

La molécule CD69 est un homodimère composé de deux chaînes polypeptidiques liées entre elles par un pont disulfure avec un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique. La queue cytoplasmique de la molécule CD69 humaine est associée aux protéines Jak/Stat5. Jak : *Janus kinase family*, Stat : *signal transducer and activator of transcription* [340].

Son expression sur les lymphocytes T, dès leur activation, suggère un rôle dans l'induction de l'activation et/ou la différenciation de ces cellules. Une étude cinétique d'expression de la molécule CD69 montre que son taux d'expression est important après 4h de stimulation des lymphocytes T humains par le mitogène PHA et atteint un plateau après 24h d'activation pour diminuer ensuite au bout de 120h [341]. Le couplage du domaine cytoplasmique de CD69 à la voie Jak 3/ Stat 5 est impliqué dans la régulation de la différenciation des lymphocytes Th17. Ainsi, les souris CD69 KO présentent une augmentation des réponses pro-inflammatoires de type Th17 et une susceptibilité à développer des maladies inflammatoires de type auto-immunes comme par exemple l'arthrite induite expérimentalement par le collagène [340]. Il a été aussi montré qu'en présence de PMA, la stimulation de la molécule CD69 par un anticorps induit, la production d'IL-2 par les lymphocytes T, ce qui augmente leur prolifération et, dans les macrophages, la synthèse du TNF- α ainsi que la production des enzymes NOS (nitric oxide synthase) suggérant que la molécule CD69 joue un rôle pro-inflammatoire. De plus, l'activation de la molécule CD69 par des anticorps induit un influx calcique [342]. En revanche, une étude a montré que le couplage de CD69 à un anticorps spécifique induit *in vitro* la production de TGF- β dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que dans les cellules NK et les macrophages. Ces études suggèrent une fonction duelle de la molécule CD69 qui est à la fois anti- et pro-inflammatoire. De plus, il a été montré que la molécule

CD69 participe à l'inhibition de la sortie des lymphocytes T des ganglions lymphatiques. En effet, les lymphocytes T de souris déficientes pour la molécule CD69, contrairement aux lymphocytes T de souris sauvages, ne sont pas retenus dans les ganglions lymphatiques après infection par le virus de la chorio-méningite ou le traitement par le poly(I:C) (ou *polyinosine polycytidylic*) qui est un inducteur d'IFN- α/β [343]. En effet, la sortie des lymphocytes T du ganglion lymphatique implique l'action du récepteur S₁P₁ (ou *sphingosine 1-phosphate receptor-1*) et de son ligand lipidique la S1P (*Sphingosine-1 phosphate*). Le récepteur S1P1 est exprimé à un niveau élevé par les lymphocytes T et B naïfs. Quant à la concentration du ligand S1P, elle est plus élevée dans le sang et la lymphe que dans les tissus lymphoïdes. Le récepteur S1P1 est chimiotactique en réponse au S1P ce qui permet la sortie des lymphocytes T des organes lymphoïdes centraux et périphériques. Une étude a montré que les molécules CD69 humaines et murines interagissent avec le récepteur S1P1 au niveau des domaines extracellulaire et transmembranaire entraînant son inhibition et donc la rétention des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques [343].

b) La molécule CD45

La molécule CD45 (ou *Leukocyte common antigen*) est une tyrosine phosphatase exprimée à la surface de tous les leucocytes. Représentant 10 % de l'ensemble des protéines membranaires, elle est composée d'une partie cytoplasmique, une partie extracellulaire et un domaine transmembranaire. La partie intracellulaire est longue et contient deux domaines cytoplasmiques D1 et D2 qui sont responsables de l'activité phosphatase. Le domaine D1 contient la poche à substrat et un motif inhibiteur. Un processus de régulation négative a lieu lorsque deux molécules CD45 forment des dimères. La partie extracellulaire est composée de 5 domaines avec des sites de glycosylation de type O et N glycosylations et des domaines fibronectines. Le domaine N-terminal riche en O-glycanes est codés par trois exons 4, 5 et 6 (ou A, B et C). Le gène codant pour la molécule CD45 subit un épissage alternatif au niveau de ces trois exons A, B et C ce qui permet de générer au moins 6 isoformes de tailles différentes. L'isoforme CD45RO est la plus petite du fait qu'elle ne contient aucun des exons A, B et C alors que l'isoforme CD45RABC (encore appelée B220) est la plus grande isoforme puisque contenant les trois exons A, B et C (*cf. Figure 14*).

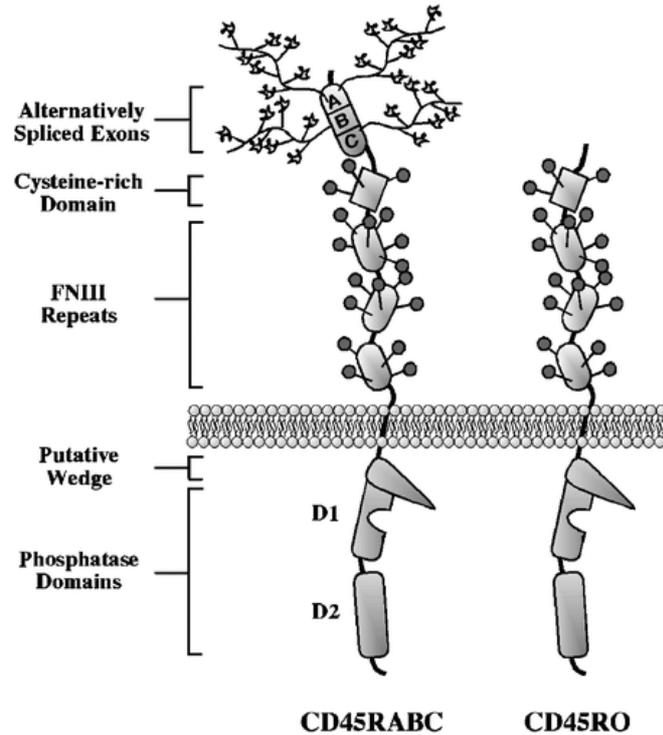


Figure 14 : Structure de la phosphatase de membrane CD45.

Plusieurs isoformes de la molécule CD45 sont exprimées à la surface des leucocytes du fait d'épissage alternatif au niveau des trois exons 4 (A), 5 (B) et 6 (C). Sur cette figure n'est montrée que l'isoforme la plus grande (RABC ou B220) contenant les trois domaines A, B et C et l'isoforme la plus petite RO qui ne contient aucun de ces exons. Ces exons codent pour des sites O-glycosylation. La molécule CD45 contient un seul domaine transmembranaire et une longue queue C-terminale. L'activité phosphatase réside dans le domaine D1 qui contient la fois la poche à substrat et le motif inhibiteur [344].

Bien que les ligands de CD45 soient encore inconnus, il a été proposé que la galectine 1 soit un ligand puisque les lymphocytes T de souris déficientes pour la molécule CD45 sont résistants à l'apoptose induite par la galectine-1, contrairement aux lymphocytes T de souris sauvages [344].

La molécule CD45 joue un rôle très important dans la régulation de l'activation du récepteur d'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR) ainsi que dans la régulation des voies de signalisation couplées aux récepteurs des cytokines. La molécule CD45 semble aussi impliquée dans la mort des thymocytes et des lymphocytes T et B périphériques. En effet, il a été montré que l'activation de la molécule CD45 par un anticorps spécifique induit l'apoptose de lignées de lymphocytaires T et B, semblable à celle induite par le récepteur de mort Fas [345].

La régulation de la fonction phosphatase de la molécule CD45 est dépendante de la capacité des isoformes à former des homodimères. Ainsi, la plus petite isoforme CD45RO est capable de former des dimères plus efficacement et rapidement que les autres isoformes du fait qu'elle n'exprime pas les O-glycosylations présentes sur les parties codées par les exons subissant l'épissage alternatif. Le rapprochement de deux unités CD45RO cause le blocage du domaine enzymatique D1 d'une molécule par le motif inhibiteur de l'autre molécule inhibant ainsi l'activité phosphatase. De plus, l'expression des isoformes varie en fonction du stade d'activation des cellules. Les lymphocytes T naïfs expriment l'isoforme CD45RA (RB dans le cas des souris) alors que les lymphocytes T effecteurs/mémoires expriment l'isoforme CD45RO. Un modèle a été proposé dans lequel l'activité phosphatase de CD45 est régulée par l'équilibre entre les monomères et dimères

exprimés par la cellule. Par exemple, les lymphocytes T naïfs exprimant les grandes isoformes CD45RAB ou CD45RABC forment plus de monomères que de dimères à cause des O-glycosylation dans les domaines extracellulaires ce qui favorise donc l'activité phosphatase. A l'inverse, dans les lymphocytes T effecteurs/mémoires, la forte expression des petites isoformes CD45RO est en faveur de la formation de dimères inhibant ainsi l'activité phosphatase [344].

L'isoforme B220 est un marqueur de différenciation des lymphocytes B murins et un marqueur d'apoptose des lymphocytes T humains [346] et murins [347]. En effet, une activation soutenue des lymphocytes T effecteurs humains et murins induit une expression de la molécule B220 suivie par leur apoptose par la voie Fas/FasL. De plus, cette isoforme est aussi prédominante sur les lymphocytes T périphériques de phénotype CD4⁻CD8⁻ (DN) B220⁺ qui s'accumulent chez les patients ALPS et les souris MRL/*lpr* qui se caractérisent par une déficience dans l'expression membranaire du récepteur Fas ou de son ligand (mutation *gld* chez la souris) [344,348]. Notre équipe a montré que l'élimination spécifique de la population de lymphocytes T DN B220⁺ responsables des pathologies auto-immunes des souris MRL/*lpr* par un traitement à l'As₂O₃ (ou Trioxyde d'Arсениc) réduit la sévérité de la maladie auto-immune en bloquant les destructions tissulaires et la production d'auto-anticorps et normalisent les taux en cytokines inflammatoires et de type Th1. La durée de vie des animaux est également significativement augmentée puisqu'elle passe de 4 mois à 2 ans. Ce traitement est bien spécifique de la population de lymphocytes T DN B220⁺ puisque le traitement de souris sauvages MRL^{+/+} n'a aucun effet sur ses cellules [349].

c) La molécule CD44

La glycoprotéine CD44 est une molécule d'adhésion qui est exprimée par la plupart des types cellulaires. La molécule CD44 est responsable de l'adhérence à la matrice extracellulaire en se fixant sur son ligand, l'acide hyaluronique (HA). Le pré-ARNm du gène *cd44* subit un épissage alternatif donnant potentiellement plus de 1000 isoformes différentes en plus de la forme standard. La protéine contient deux régions variables dont la première au niveau du domaine extracellulaire et la deuxième au niveau de la queue cytoplasmique (*cf. Figure 15*). L'isoforme standard (CD44s ou CD44h), qui est la plus petite, résulte de l'élimination par épissage alternatif des exons variables v1 à v10 ainsi que l'exon 19 chez la souris et v2 à v10 ainsi que l'exon 18 chez l'Homme [350].

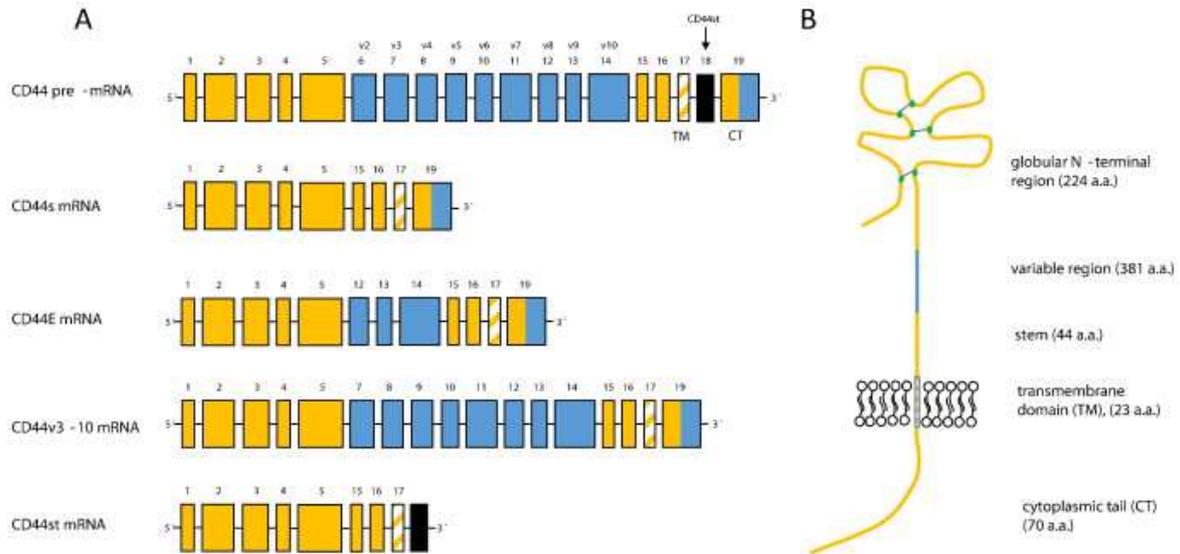


Figure 15 : Structure de la molécule CD44 humaine.

A. Structure du pré-ARNm humain codant pour CD44. Les boîtes oranges représentent les exons constitutifs et les bleues représentent les exons variables soumis à l'épissage alternatif. La boîte hachurée représente l'exon 17 codant pour 23 acides aminés de la queue cytoplasmique. L'exon 18 représenté en noir est non codant et contient un UTR-3' précoce (ou *untranslated region*). L'inclusion de l'exon 18 donne un ARNm avec une queue cytoplasmique courte CD44st qui n'est pas capable de fixer l'HA et qui est exprimé dans les chondrocytes, les cellules lymphoïdes et les fibroblastes. L'exon 19 (exon 200 dans la souris) code pour 70 acides aminés. L'exon v1, non représenté, n'est pas exprimé chez l'Homme. Le domaine TM est codé par l'exon 18 chez la souris. L'isoforme CD44E est présent dans les cellules épithéliales, les isoformes CD44v8-10 et CD44s (pour standard) sont présentes dans les cellules hématopoïétiques. L'isoforme CD44v3-10 est détectée dans les kératinocytes, le canal pancréatique et la thyroïde et les bronches. **B.** Structure de la protéine CD44. Les couleurs correspondent à celles présentées dans la structure génomique. Les sites variables de CD44 sont O-glycosylés. Le domaine N-terminal contient 3 ponts disulfures et deux motifs hyaluronic. Le nombre estimé d'isoformes potentiels est de 1000 [350]

L'expression de CD44 augmente à la surface des lymphocytes T naïfs après leur activation par le TCR aboutissant à des taux d'expression élevés de cette molécule à la surface des populations mémoires. Le rôle de CD44 dans la différenciation des lymphocytes T reste cependant mal compris [351]. La molécule CD44 est principalement associée à la migration cellulaire mais est également impliquée, selon le type cellulaire, dans d'autres fonctions comme la prolifération ou l'apoptose. Il a été montré que la molécule CD44 avec l'intégrine VLA-4 (*Very late activation antigen-4* ou intégrine $\alpha 4$) sont impliqués dans la régulation de la migration des lymphocytes T vers les sites inflammatoires. De plus, l'activation de CD44 peut activer les kinases Lck et Fyn associées au TCR et donc amplifier la transduction du signal. D'autre part, et de façon contradictoire, la molécule CD44 a été décrite comme étant associée à la fois à la susceptibilité et à la résistance à l'apoptose des lymphocytes T activés [352]. Ainsi les lymphocytes issus de souris déficientes pour cette molécule présentent une AICD réduite suite au traitement par un anticorps anti-CD3 et l'entérotoxine A staphylococcique. En outre, il a été montré que l'activation de CD44 induit la translocation de FasL à la surface des lymphocytes T au cours du processus d'AICD. En revanche, l'isoforme v7 CD44 semble être impliquée dans la survie des lymphocytes T effecteurs puisque les souris déficientes pour la région v7 de CD44 sont résistantes à la colite induite par le trinitrobenzene sulfonate (TNBS). De même, le transfert de cellules de la moelle osseuse de souris déficientes pour v7 protège les souris receveuses d'une colite. L'implication de CD44 dans la réponse des lymphocytes T mémoires CD4⁺ Th1 a aussi été montrée dans un modèle d'influenza. En effet, les lymphocytes effecteurs sont capables de se diviser mais

INTRODUCTION

meurent par apoptose dans les conditions où CD44 est inhibée par un anticorps ou par délétion génétique suggérant un rôle de cette molécule dans l'homéostasie des lymphocytes T effecteurs [352].

L'activation du récepteur P2X7 par l'ATP induit un clivage de la molécule CD44 dans la lignée macrophagique murine P388D1 [353]. Ainsi des formes solubles de cette molécule sont présentes dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de différents types de cancers métastatiques et probablement participe à la gravité des maladies [354]. Le clivage de CD44 par des métalloprotéases, qui peut aussi avoir lieu après la fixation à son ligand HA, participe à la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire.

En se basant sur le taux d'expression de l'ensemble de ces molécules d'activation nous pouvons proposer une cinétique d'expression de ces marqueurs à la surface des lymphocytes T en fonction de leur stade d'activation (*cf* **Tableau 6** et **Figure 16**)

Tableau 6: Tableau décrivant les phénotypes des différents stades d'activation des lymphocytes T

Stade	Phénotype des lymphocytes T
Naïf	CD45RB ^{high} CD44 ^{low} CD69 ⁻ B220 ⁻
Activé en réponse immunitaire primaire	CD45RB ^{low} CD44 ^{high} CD69 ⁺ B220 ⁻
Effecteur/mémoire	CD45RB ^{low} CD44 ^{high} CD69 ⁻ B220 ⁻
Effecteur/mémoire activé en réponse immunitaire secondaire	CD45RB ^{low} CD44 ^{high} CD69 ⁺ B220 ⁻
Apoptotique	CD45RB ^{low} CD44 ^{high} CD69 ⁻ B220 ⁺

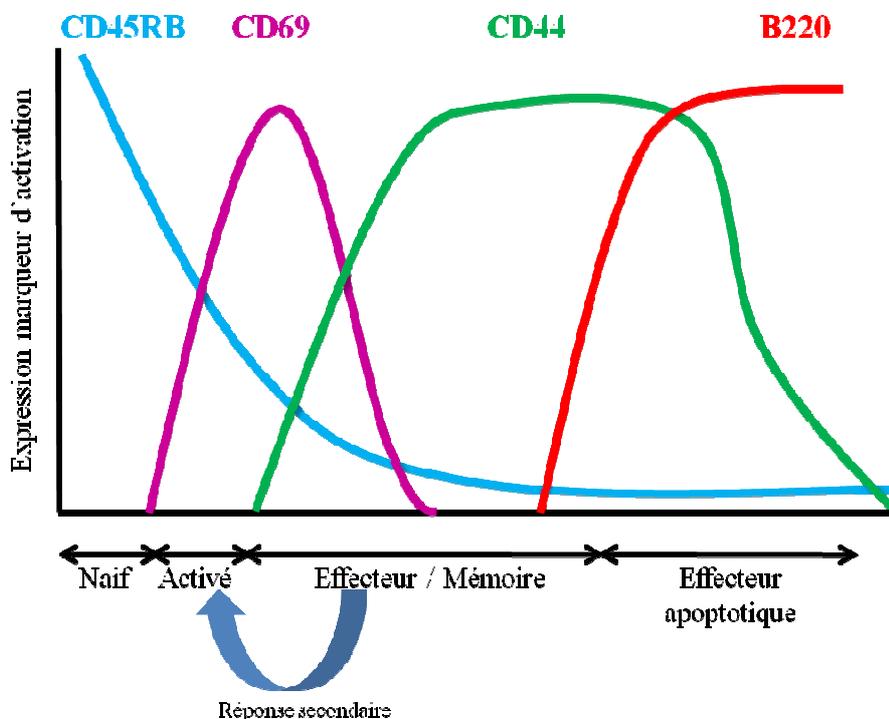


Figure 16 : Modulation de l'expression des marqueurs d'activation CD45RB, CD69, CD44 et B220 à la surface des lymphocytes T au cours de l'activation.

INTRODUCTION

Le récepteur P2X7 est impliqué dans la prolifération [252], l'activation [11] ou encore la mort cellulaire des lymphocytes T matures [280,282] ainsi que dans le développement d'une petite sous-population particulière de lymphocytes T de phénotype CD4⁻CD8⁻ TCR $\gamma\delta^+$ [355]. Ces lymphocytes $\gamma\delta^+$ expriment des taux élevés de P2X7 et sont capables de sécréter de grandes quantités d'ATP en réponse à la stimulation du TCR. La délétion génétique du récepteur P2X7 conduit à la production de lymphocytes T ayant exclusivement un TCR de phénotype $\alpha\beta$. D'autre part, le rôle du récepteur P2X7 a aussi été montré dans la transition du phénotype T régulateur au phénotype Th17 [356].

Plusieurs groupes se sont intéressés au rôle de la molécule CD45 dans la régulation du récepteur P2X7. Chused et coll ont comparé la sensibilité à l'ATP des sous-populations de lymphocytes T à différents stades de maturation thymique et d'activation périphérique. En effet, ils ont montré que l'expression du récepteur P2X7 ainsi que les activités qui y sont associées, notamment la formation du pore et l'influx calcique, étaient réduites dans les premiers stades de maturation des lymphocytes T mais pas dans les stades les plus matures (lymphocytes T simple positifs). D'autre part, parmi les sous-populations de lymphocytes T périphériques, les lymphocytes T CD4⁺ incorporaient plus les sondes fluorescentes, internalisaient plus de calcium et présentaient un taux d'expression plus élevée du récepteur P2X7 que les lymphocytes T CD8⁺. Concernant l'état d'activation, l'expression du récepteur P2X7 ainsi que les activités pore et influx calcique étaient corrélées aux taux d'expression des molécules d'activation CD45RB et CD44 : les lymphocytes T naïfs CD45RB^{high} CD44^{low} exprimant de faibles taux en récepteur P2X7 alors les lymphocytes T mémoires CD45RB^{low} CD44^{high} exprimant de forts taux de ce récepteur [357].

Les travaux d'Elliot et coll. ont ensuite suggéré que la phosphatase de membrane CD45RB est un régulateur négatif du récepteur P2X7. En effet, ils ont montré que la population de lymphocytes T CD45RB^{low} est plus sensible à l'externalisation de la PS induite par l'ATP que les lymphocytes T CD45RB^{high} [285]. De plus, le même groupe a proposé que les activités induites par ce récepteur soient toutes liées et exécutées en même temps dès que le récepteur P2X7 est activé. De plus, l'externalisation de la PS est impliquée dans les autres activités dépendants du récepteur P2X7 à savoir l'activité canal et le clivage de la molécule CD62L [285].

Aswad et coll ont montré que les lymphocytes Trég CD4⁺ CD25⁺ sont plus sensibles à la mort cellulaire induite par le NAD ou le BzATP. Ainsi les souris déficientes pour le récepteur P2X7 présentent un nombre plus élevé de lymphocytes Trég CD4⁺ CD25⁺ en périphérie que les souris sauvages [282]. Cependant, cela a été contredit par le groupe de Taylor qui a proposé que la sensibilité des lymphocytes Trég et des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels est inversement corrélée au taux d'expression en molécules CD45RB [283]. De plus, ce groupe trouve un même nombre de lymphocytes Trég chez les souris sauvages et les souris déficientes pour le récepteur P2X7.

Ces résultats contradictoires montrent que d'autres études sont nécessaires afin de préciser la sensibilité à la voie P2X7/ATP des sous-populations de lymphocytes T à leur différent stade d'activation. Afin de mieux caractériser la réponse des différentes sous-populations de lymphocytes T à l'activation du récepteur P2X7, il est nécessaire d'utiliser

des marqueurs d'activation supplémentaires comme CD69, CD44 et B220 qui permettent de délimiter de façon plus précise les stades d'activation y compris le stade pré-apoptotique.

d) Le récepteur P2X7 et les maladies du système immunitaire

Du fait de son rôle dans l'activation de l'inflammasome, le rôle du récepteur P2X7 dans le développement des maladies inflammatoires a été étudié notamment dans certaines maladies auto-immunes présentant une réponse inflammatoire exacerbée. L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur P2X7 dans le modèle induit de sclérose en plaques (EAE ou *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) a donné des résultats contradictoires. Les souris P2X7 KO générées par les laboratoires GlaxoSmithKline (GSK) développaient une forme atténuée d'EAE [358] alors que les souris P2X7 KO générées par les laboratoires Pfizer développaient une forme complète, voire exacerbée, de la maladie [359]. Cela suggère que l'isoforme K, exprimée par les souris P2X7 KO des laboratoires GSK, protège de l'EAE. Plus récemment, il a été décrit que la pannexine-1, du fait de sa perméabilité à l'ATP, joue un rôle dans la sévérité de l'EAE. Ainsi, les souris déficientes pour la pannexine-1 présentent une réduction des signes cliniques de l'EAE et de la mortalité par rapport aux souris WT [360].

Dans la néphrite d'origine lupique, il a été montré que le blocage du récepteur P2X7 par le BBG ou des siRNA atténue les lésions inflammatoires rénales et diminue les taux de sécrétion d'IL-1 β et d'IL-17, la production d'auto-anticorps anti-ADN double brin ainsi que le nombre de lymphocytes Th17 par rapport aux lymphocytes Trég [361] ce qui est cohérent avec le rôle joué par le récepteur P2X7 dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde induite par le collagène. Ainsi, il a été montré que les souris P2X7 KO présentent des symptômes cliniques réduits accompagnés d'une diminution de la production d'IL-1 β [362].

Du fait de l'effet bénéfique du blocage du récepteur P2X7 dans les modèles murins, l'utilisation des antagonistes de ce récepteur a été évaluée dans des essais cliniques chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de douleur chronique et de sclérose en plaques. Seulement deux antagonistes du récepteur P2X7, le AZD9056 (AstraZeneca) et le CE-224,535 (Pfizer), ont été utilisés chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde réfractaire au traitement par le méthotrexate ou bien le sulfasalazine. Ces médicaments ont passé la phase clinique II pour leur efficacité et leur sécurité mais ne présentaient pas d'avantage thérapeutique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde [363, Bartlett, 2014 #1125]. Bien que ces antagonistes ne présentent pas d'avantage thérapeutique, il est possible que l'efficacité de ces composés soit dépendante du génotype du gène *p2x7*.

L'implication du récepteur P2X7 a également été décrite dans la colite. En effet, de grande quantité d'ATP est sécrétée par les bactéries commensales ce qui induit la différenciation des lymphocytes Th17. De plus, les souris sans germe présentent de faibles concentrations d'ATP dans l'intestin accompagnées par un nombre réduit de lymphocytes Th17 dans la lamina propria [111,364]. Plus récemment, il a été montré que, chez des patients atteints de maladie de Crohn, les macrophages et les DC de l'épithélium et de la

lamina propria présentent une surexpression du récepteur P2X7 qui s'accompagne d'une production accrue en TNF- α , IL-1 β et IL-17 [365].

Du fait de son rôle important dans l'inflammation et la mort cellulaire, l'implication du récepteur P2X7 est très étudiée dans le développement des cancers. Dans certains types de cancer, il a été rapporté une diminution de l'expression du récepteur P2X7 ainsi que des mutations perte de fonction associées à la pathogénèse de la LLC. D'autre part, les mutations de perte de fonction peuvent être associées à un risque élevé de développement d'une métastase chez des patientes ayant un cancer du sein conduisant à une insensibilité à la chimiothérapie. Cela est lié au fait que les DC doivent présenter les antigènes issus des cellules tumorales mourantes aux lymphocytes T afin d'induire la production d'IFN- γ . Les cellules mourantes sécrètent de l'ATP qui active le récepteur P2X7 exprimé par les DC qui ensuite active la voie de l'inflammasome et déclenche la réponse anti-tumorale [111].

Objectif du travail de Thèse

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Notre équipe s'intéresse au rôle des récepteurs de mort Fas, de la tyrosine phosphatase de membrane B220 et du récepteur purinergique P2X7 dans l'homéostasie des lymphocytes T et donc le développement des maladies auto-immunes de type systémique.

Notre laboratoire utilise comme modèle d'étude du développement du lupus érythémateux disséminé (LED) la souris MRL/*lpr*. Cette souris présente une mutation homozygote du gène codant pour le récepteur d'apoptose Fas. Cette mutation appelée *lpr* (pour *lymphoprolifération*) est responsable d'une accumulation massive, dans les organes lymphoïdes secondaires (splénomégalie et adénopathies), de lymphocytes T activés de phénotype inhabituels CD4⁻CD8⁻ (DN) TCR αβ⁺ B220⁺ ainsi que de pathologies auto-immunes systémiques dont un lupus érythémateux disséminé (LED), une polyarthrite rhumatoïde et un syndrome de Sjögren. Cependant, la sévérité des pathologies résultant de mutations du récepteur Fas est dépendante, aussi bien chez l'Homme (syndrome ALPS) que chez la souris, du fond génétique indiquant que d'autres loci sont impliqués. Ainsi, dans le cas de Lupus, plus de 11 loci de susceptibilité ont été décrits à ce jour. Il a récemment été montré que des mutations dans le gène codant pour le récepteur P2X7 sont associées à une plus grande susceptibilité au LED dans une population chinoise [366]. Notre laboratoire a choisi d'utiliser le modèle de souris MRL/*lpr*, homozygotes pour la mutation *lpr* du gène Fas, du fait des fortes similitudes avec les pathologies développées par les patients lupiques. En effet, la souris MRL/*lpr* présente : (i) des syndromes auto-immuns spontanés, prédictibles et qui se développent rapidement ; (ii) de grande quantité d'auto-anticorps anti-ADN double brin dans le sérum ; (iii) de nombreuses destructions tissulaires au niveau de la peau, des reins, des poumons ou encore des vaisseaux ; (iii) un fort dimorphisme sexuel en défaveur des femelles ; (iv) une variabilité de la sévérité de la maladie entre les souris bien qu'il s'agisse d'une lignée pure. Comparées aux souris MRL/*lpr*, les souris B6 déficientes en récepteur d'apoptose Fas (B6/*lpr*) ne développent pas de maladies auto-immunes et présentent une faible lympho-accumulation.

Récemment, nous avons montré que les lymphocytes T pathogènes DN B220⁺ qui s'accumulent dans les organes lymphoïdes secondaires des souris MRL/*lpr*, ainsi que les lymphocytes T B220⁺ pré-apoptotiques en fin de réponse immunitaire chez les souris normales MRL^{+/+} et B6, sont totalement réfractaires à l'activation du récepteur P2X7 [367]. Ces lymphocytes T B220⁺ ne sont pas capables de former le pore, d'externaliser la PS, de cliver CD62L ni d'induire un influx calcique même en réponse à des fortes doses d'ATP et de NAD. L'analyse de l'expression du récepteur P2X7 montre que ces lymphocytes T ne présentent aucun défaut transcriptionnel ou traductionnel du récepteur puisque de grandes quantités d'ARNm et de protéines P2X7 sont présentes dans ces lymphocytes T. Cependant, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme native du récepteur P2X7 montre qu'il n'est pas adressé à la membrane des lymphocytes T B220⁺ suggérant une perte d'adressage de ce récepteur à la surface de cette population (ARTICLE 2, voir ANNEXE).

Notre travail ainsi que les résultats contradictoires des groupes de Taylor, Elliot et Aswad concernant le rôle potentiel de la molécule CD45RB dans l'inhibition du récepteur P2X7 nous ont amenés à poser les questions suivantes :

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

- 1. A quel stade de leur activation, les lymphocytes T perdent-ils l'expression membranaire du récepteur P2X7 et donc ses activités ?**
- 2. Est-ce que toutes les sous-populations de lymphocytes T présentent la même sensibilité aux différentes activités cellulaires induites par le récepteur P2X7 ? En d'autres termes existe-il une dissociation des activités du récepteur P2X7 en fonction de la sous population de lymphocytes T CD4 (Th1, Th2, Th17, Trég) ou CD8 et aussi en fonction du stade d'activation de chacune de ces sous-populations ?**
- 3. Du fait du grand polymorphisme de P2X7, est-ce que l'on peut associer l'expression d'une isoforme à une sous-population particulière de lymphocytes T voire à un stade d'activation ?**
- 4. Quelle(s) isoforme(s) de la phosphatase de membrane CD45 joue(nt) un rôle de régulateur négatif des activités du récepteur P2X7 ?**
- 5. La sensibilité du récepteur P2X7 est-elle liée à son taux d'expression globale ou au taux d'expression d'une isoforme particulière ?**

L'objectif de ma thèse a donc été d'étudier la modulation de la sensibilité des différentes sous-populations de lymphocytes T spléniques, à l'activation du récepteur P2X7, selon leur stade d'activation.

Pour cela, nous avons choisi la technique de cytométrie en flux qui nous permet de réaliser simultanément une étude phénotypique des sous-populations de lymphocytes T à différents stades d'activation et une étude fonctionnelle du récepteur P2X7 dans ces différentes sous-populations. Dans un premier temps, nous avons défini les différentes sous-populations de lymphocytes T spléniques CD90⁺ B220⁻ en se basant sur le taux d'expression des marqueurs d'activation : CD69 et CD44. Ces deux marqueurs permettent de définir 4 stades de différenciation des lymphocytes :

- mature naïf : CD69⁻ CD44^{low}
- récemment activé en réponse immunitaire primaire : CD69⁺ CD44^{low}
- effecteur/mémoire : CD69⁻ CD44^{high}
- effecteur/mémoire réactivé en réponse secondaire : CD69⁺ CD44^{high}

Dans ces différentes sous-populations de lymphocytes T, nous avons ensuite étudié les différentes activités du récepteur P2X7 en réponse à une stimulation par l'ATP :

- ouverture du canal calcique
- formation du pore
- clivage de la molécule CD62L
- externalisation de la PS

Nos résultats montrent que les activités du récepteur P2X7 induite par la stimulation à l'ATP ne sont pas toutes exécutées en même temps et diffèrent avec le stade d'activation de la sous-population de lymphocytes T.

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

1. Alors que les lymphocytes T matures naïfs ($CD69^- CD44^{low}$) ou récemment activés en réponse immunitaire primaire ($CD69^+ CD44^{low}$) sont capables de cliver efficacement la molécule CD62L de leur surface en réponse à 500 μ M d'ATP, les lymphocytes T effecteurs/mémoires au repos ($CD69^- CD44^{high}$) ou en réponse immunitaire secondaire ($CD69^+ CD44^{high}$) sont résistants à ce clivage. Ces derniers ne présentent pas de défaut d'ADAM-17 mais requièrent de très fortes concentrations d'ATP pour pouvoir induire le clivage de CD62L.
2. De façon surprenante, les lymphocytes T au stade effecteur/mémoire sont parfaitement capables de former le pore et d'externaliser la PS en réponse à l'ATP.
3. Les lymphocytes T activés en réponse immunitaire primaire ($CD69^+ CD44^{low}$) sont les plus sensibles à la formation du pore après une stimulation par 500 μ M d'ATP.
4. Les sous-populations de lymphocytes T récemment activés, aussi bien en réponse immunitaire primaire ($CD69^+ CD44^{low}$) que secondaire ($CD69^+ CD44^{high}$), sont les plus sensibles à l'externalisation de la PS.

Nos résultats suggèrent que les activités du récepteur P2X7 sont dissociées et que l'intensité avec laquelle chacune est réalisée dépend du stade d'activation du lymphocyte T. Lors de l'activation du récepteur P2X7, l'activité de clivage de CD62L est exécutée différemment des deux autres activités pore et externalisation de la PS suggérant une voie de signalisation différente. De plus, comme mentionné dans l'introduction, un lien entre l'activité de formation du pore et l'externalisation de la PS a été décrit. La concentration en calcium peut être modulée par l'activation du canal calcique dépendant du récepteur P2X7 ou bien d'autres canaux existants dans les lymphocytes T. Pour cela nous avons étudié les activités de clivage de CD62L, de formation du pore et d'externalisation de la PS en présence de chélateurs du calcium intra et extracellulaire. Nos résultats montrent que :

5. Le clivage de CD62L ne dépend pas du taux de calcium. En revanche, dans la sous-population lymphocytaire T récemment activé en réponse immunitaire primaire ($CD69^+ CD44^{low}$), celle qui est la plus sensible à la formation du pore, cette activité dépend du calcium intracellulaire alors que l'externalisation de la PS dépend à la fois du calcium extracellulaire et intracellulaire. Il semble que le calcium intracellulaire contrôlant l'activité d'externalisation de la PS provient de l'influx du calcium extracellulaire.

Résultats

1. Article 1**Dissociation of P2X7 receptor activities in mouse T lymphocytes as they differentiate from naïve to effector and memory T state**

Hanaa Safya¹, Julie Legrand², Sylvain Le Gall³, Mohcine Benbijja^{2,4}, Amine Mellouk¹,
Colette Kanellopoulos-Langevin⁵, Jean M Kanellopoulos⁶, and Pierre Bobé^{1,2}

¹ INSERM U757, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France,

² Institut André Lwoff, CNRS, Université Paris-Sud, 94801 Villejuif, France,

³ INSERM U970, Université Paris Descartes, 75015 Paris, France

⁴ INSERM U1012, Université Paris-Sud, 94800 Le Kremlin Bicêtre, France,

⁵ INSERM U699, Université Paris Diderot, 75018 Paris, France.

⁶ CNRS UMR 8619, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

Running title: dissociation of P2X7 activities during T-cell differentiation

Correspondence to: Pierre Bobé; e-mail: pierre.bobe@u-psud.fr

Abbreviations: ConA, concanavalin A; P2X7R, P2X7 receptor; PS, Phosphatidylserine; Treg, regulatory T lymphocyte; Tconv, conventional T lymphocyte

Footnote: This work was funded by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0089-02). Hanaa Safya is the recipient of a National Council for Scientific Research (CNRS) Lebanon fellowship.

Abstract

Sensitivity to ATP varies among T-cell subsets. Previously, we reported that effector T cells that express the B220 isoform of the transmembrane phosphatase CD45 are totally resistant to ATP stimulation. Regulatory T cells (Treg) were reported to be more sensitive to ATP than conventional T (Tconv) cells. However, Treg and Tconv expressing low levels of CD45RB (CD45RB^{low}) were shown to display similar high sensitivity to ATP, whereas CD45RB^{high} Tconv had reduced ATP sensitivity. By contrast, we show herein that CD45RB^{low} Tregs and CD45RB^{high} Tconv from C57BL6/J mice displayed similar high sensitivity to ATP, whereas CD45RB^{low} Tconv showed lower sensitivity. The analysis of P2X7R-mediated cellular activities in Tconv at naïve (CD62L⁺CD44^{low}), recently activated (CD69⁺), and effector/memory (CD62L^{-/+}CD44^{high}CCR7^{-/+}) stages, revealed that CD69⁺ T cells have lost the ability to shed CD62L molecules, but not to externalize phosphatidylserine or form pores. CD62L shedding occurred efficiently in naïve or recently activated CD44^{low} T cells, but not in effector/memory CD44^{high} T cells (either CD69⁻ or CD69⁺). Phosphatidylserine exposure occurred in both naïve CD44^{low} and effector/memory CD44^{high} T cells, though more efficiently on recently activated CD69⁺ T cells. Pore formation happened at all stages of T-cell activation, but more efficiently in recently activated naïve CD69⁺CD44^{low} T cells. In this latter T-cell subset, pore formation and phosphatidylserine externalization, but not CD62L shedding, were calcium dependent. P2X7R signaling in T cells is thus far more complex than previously suspected since the expression of each P2X7-mediated cellular activity varying according to the T-cell activation stage.

Introduction

The P2X7 receptor (P2X7R) belongs to the P2X receptor family of ATP-gated cation channels. The type of molecular and cellular responses induced by P2X7R depends on the length of stimulation by high concentrations of ATP (1, 2). Brief stimulation of P2X7R induces cation-specific ion channels formation (3) and phosphatidylserine (PS) exposure in the plasma membrane (4). Prolonged activation of P2X7R results in the formation of nonselective membrane pores, permeable to molecules with a molecular mass up to 900 Da. Continuous activation of P2X7R can lead to cell death by apoptosis (5-7) and/or necrosis (8, 9), depending on the cell type. In contrast, P2X7R may trigger an anti-apoptotic or growth promoting activity (10, 11). Numerous physiological functions have been attributed to P2X7R; notably, activation of caspase-1 (12, 13), maturation and secretion of cytokines including IL-18, IL-6 and TNF- α (12, 14-17), migration of leukocytes (18), and killing of intracellular pathogens in macrophages(19, 20). Moreover, P2X7R activation triggers proteolytic cleavage of membrane proteins such as the homing receptor L-selectin (CD62L), the low affinity receptor for IgE (CD23) (21, 22), TNF- α (23), IL-6 receptor (24) and the precursor of amyloid precursor protein(25). P2X7R also regulates the early signaling events involved in T-cell activation. Upon antigen stimulation, T lymphocytes release intracellular ATP, which induces Ca²⁺ influx, NF-AT activation, and IL-2 production through P2X7R activation (26-28). Moreover, ATP secreted by intestinal commensal bacteria induces the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into Th17 cells (29). During chronic inflammation, ATP could also induce the conversion of regulatory CD4⁺ T cells (Treg) into Th17 cells (30). Sensitivity to ATP varies among the different T-cell subpopulations. Thus, CD8⁺ T cells from the spleen, lymph nodes or the liver display low levels of ATP sensitivity and P2X7R membrane expression compared to conventional CD4⁺ T cells (Tconv), whereas both are displayed at high levels in intestinal CD8⁺ T cells (31). Concerning CD4⁺ Tregs, contradictory reports have been

published about their sensitivity to P2X7R-induced cell death. In one report, CD25⁺CD4⁺ Tregs are markedly more sensitive to P2X7R stimulation than CD25⁻CD4⁺ Tconv (32). In another, the sensitivity of CD4⁺ Tregs to P2X7R stimulation is normal and similar to that of Tconvs, provided that the latter, like Tregs, express low levels of CD45RB(33). In Tconvs, the sensitivity to ATP-induced PS externalization and cell death appears to correlate with the levels of CD45RB membrane expression, an isoform of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45. Thus, CD4⁺ T cells expressing low levels of CD45RB (CD45RB^{low}) are significantly more responsive to ATP stimulation than their counterpart expressing high levels of CD45RB (CD45RB^{high}) (33, 34). Moreover, we have shown that effector T lymphocytes become totally resistant to P2X7R stimulation following expression of the B220 isoform of CD45 (or CD45RABC) at the plasma membrane (35) during the process of activation-induced cell death(36-38). The resistance of B220⁺ T lymphocytes to ATP stimulation is due to the loss of P2X7R at the plasma membrane, which is retained in the cytosol (35).

High and low levels of CD45RB expression on mouse T cells are a feature of naïve cells and antigen-activated cells, respectively (39). Therefore, one could conclude from previous reports (33, 34) that activated T cells (CD45RB^{low}) are more sensitive to ATP-induced PS externalization and cell death than naïve T cells (CD45RB^{high}). However, our data presented herein shown that the situation is far more complex. Indeed, we show that the sensitivity to ATP stimulation of CD45RB^{high} (naïve) B220⁻CD90⁺CD4⁺ Tconvs from C57BL6/J mice is significantly higher than in CD45RB^{low} (activated) CD4⁺CD90⁺B220⁻ Tconvs, and similar to that of CD4⁺ Tregs expressing a CD45RB^{low} phenotype. However, the activated CD45RB^{low} B220⁻CD4⁺CD90⁺ Tconv subset is highly heterogeneous and encompasses different stages of T-cell differentiation. Therefore, we have compared the sensitivity to ATP of recently activated T cells (CD69⁺) in primary (CD44^{low}) or secondary (CD44^{high}) immune responses. Based on the expression of L-selectin (CD62L) and

chemokine receptor CCR7, we have also analyzed P2X7R-mediated cellular activities in central-memory T cells (TCM) ($CD62L^{high}/CCR7^{+}$) and effector-memory T cells (TEM) ($CD62L^{low}/CCR7^{-}$) subsets. We showed herein that CD69-negative $CD62L^{+}$ T lymphocytes efficiently shed their CD62L molecules following ATP treatment, but lost this ability after expression of the activation marker CD69. However, activated $CD69^{+}$ T lymphocytes maintain their ability to externalize PS and form pore. Expression of CD69 can occur on antigen-activated T lymphocytes with low or high levels of CD44. Interestingly, CD62L shedding is efficiently induced in ATP-treated $CD44^{low}$ T lymphocytes (either naïve or recently activated), but not in effector/memory $CD44^{high}$ T lymphocytes (recently activated or not) regardless to the expression of CCR7. PS exposure occurs in both $CD44^{low}$ and $CD44^{high}$ T lymphocytes upon ATP treatment, but with more efficiency on $CD69^{+}$ T lymphocytes. Pore formation happens also at all stages of T-cell activation, but with more efficiency in $CD69^{+}$ $CD44^{low}$ T lymphocytes. In recently activated $CD69^{+}CD44^{low}$ T lymphocytes, we found that pore formation and PS externalization, but not CD62L shedding, occurred in response to ATP in a calcium-dependent manner. To our knowledge, this is the first report describing dissociation of P2X7R cellular activities during activation of T lymphocytes.

Materials and Methods

Mice

Wild-type C57BL/6J (B6) and P2X7R-deficient C57BL/6 (B6P2X7R^{-/-}, eighth backcross on B6) mice originally from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) were maintained at our animal facility. All the experiments were conducted in accordance with French (décret n°87-848) and European Economic Community (directive 86/609/CEE) guidelines for the care of laboratory animals and approved by our local research ethics committee.

Reagents

ATP (adenosine-5'-triphosphate), PMA (phorbol myristate acetate), KN-62 (1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) and concanavalin A (ConA), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Calcium chelator BAPTA-AM was from Life Technologies (Carlsbad, CA). Propidium iodide (PI) and YO-PRO-1 were purchased from Invitrogen-Molecular Probes (Cergy Pontoise, France). Metalloprotease inhibitor GM6001 were from Chemicon International (Temecula, CA). Annexin V was from eBioscience (San Diego, CA). Cell fixation and permeabilization buffer were purchased from eBioscience.

Cell preparation, Cell-surface phenotyping and T-cell subsets isolation

Spleen cell suspensions were prepared from 2 to 12-mo-old mice. Red blood cells were removed from cell suspensions by hypotonic lysis with an ammonium chloride lysing solution. For phenotyping analyses by flow cytometry and isolation of T-cell subsets by fluorescence activated cell sorting (FACS), spleen cell suspensions (1×10^6 cells/condition) were stained using either APC-, APC efluor 780-, Efluor 450-, Pe Cy5-, FITC-, PE- or biotin-conjugated monoclonal antibody (mAb): rat anti-CD90/Thy1.2 (clone

HIS 51), anti-CD4, anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-CD44 (clone IM7), anti-B220 (clone RA3 6B2), anti-CD62L (clone MEL 14), anti-Foxp3 (eBioscience), anti-CCR7 (clone 4B12). P2X7R was detected using a rabbit polyclonal anti-P2X7R serum generated by genetic immunization as described previously(35) and alexa fluor 488- or FITC-conjugated goat anti rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies (Calbiochem). Rat IgG2a, IgG2b or Armenian Hamster IgG mAbs were used as the isotype control (eBioscience). Use of mAb to mouse Fcγ receptor (eBioscience) avoided non-specific antibody binding. All flow cytometric analyzes were performed using CyFlow (Partec, Sysmex Münster, Germany), Cyan ADP LX or MoFLo Astrios (Beckman Coulter, Inc.) flow cytometers, and Flow Max (Partec, Sysmex) or Summit 6.2 (Beckman Coulter, Inc.) softwares.

Flow cytometry analysis of CD62L shedding, PS exposure, Pore formation

Single-cell suspensions from spleen (1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium) were treated or not with 0.5, 1, 2 or 4 mM ATP or 25 ng/ml PMA for 30 min at 37°C with 5% CO₂. To analyse CD62L shedding and PS exposure, spleen cells were stained with fluorochrome-labeled anti-CD62L mAb and Annexin V. When mentioned, cells were pretreated with P2X7R antagonist KN-62, metalloprotease inhibitor GM-6001 for 15 min, or calcium chelators BAPTA-AM (10 μM) or EGTA (5 mM) or both for 30 min at 37°C prior stimulation with ATP or PMA. To analyze pore formation, spleen cells were pretreated with 0.5 μM YO-PRO-1 fluorescent probe prior stimulation with ATP or PMA. When mentioned, cells were pretreated with 10 μM intracellular calcium chelator 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM), or 0.5 mM extracellular calcium chelator EGTA for 30 min at 37°C with 5% CO₂ before stimulation with ATP.

Plasmid and cell transfections

COS-7 fibroblasts were transiently transfected with a pCDEF3 expression vector containing CD45RABC cDNA (kindly provided by Dr A. Weiss, UCSF, San Francisco, CA) using the transfection reagent Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). At 48h after transfection, COS-7 cells were stained with FITC-conjugated anti-CD45RA (clone 14.8), PE-conjugated anti-CD45RB (clone 16A), APC-conjugated anti-CD45RC (clone GL24), PE Cy5.5-conjugated anti-CD45RABC (clone RA3-6B2), and analyzed by flow cytometry.

Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm SE. Comparisons between untreated and treated groups were made by Student's t-test. Statistical difference was accepted at $P \leq 0.05$.

Results

Activated CD45RB^{low} T cells display lower sensitivity to ATP than naïve CD45RB^{high} conventional T cells

Previously we had shown that effector T cells at pre-apoptotic stage (B220⁺) are resistant to ATP stimulation (35). Since effector T cells express low levels of CD45RB (39) our findings appear contradictory to reports (33, 34) showing that CD45RB^{low} (activated or effector) Tconvs are notably more sensitive to P2X7R-mediated PS exposure and cell death than CD45RB^{high} naïve Tconvs. To explain this discrepancy, we have hypothesized that anti-CD45RB mAb used to gate CD45RB^{high} T cells in these reports (33, 34) also detect P2X7R-defective B220⁺ (or CD45RABC⁺) T cells because anti-CD45RB mAb recognizes an exon B-dependent epitope (40). To test our hypothesis we first transfected CD45-negative COS7 epithelial cells with plasmid vector coding for mouse CD45RABC (or B220), and then stained COS7 cells with fluorescent anti-B220, anti-CD45RA, anti-CD45RB and anti-CD45RC mAbs. As shown in Figure 1, anti-CD45RB mAbs recognize CD45RABC⁺ COS7 cells, but not CD45RABC⁻ COS7 cells, indicating that anti-CD45RB mAb (clone 16A) are unable to distinguish between CD45RB and CD45RABC isoforms. Likewise, anti-CD45RA and anti-CD45RB mAbs recognize CD45RABC⁺ COS7 cells. Therefore, all subsequent experiments had been performed on gated B220-negative T cells. Second, we have evaluated the sensitivity to ATP of B220⁻ CD90⁺ Tconvs (either CD45RB^{low} or CD45RB^{high}), and found that CD45RB^{high} T cells display higher sensitivity to ATP-mediated CD62L shedding, PS exposure, pore formation and cell death than CD45RB^{low} T cells (Fig. 1). Therefore, our data suggest that T-cell activation leads to a decrease in sensitivity to ATP stimulation.

Recently activated CD69⁺ T-cells externalize PS and form pore but do not shed homing receptor CD62L following ATP treatment

Since activated T cell display reduced sensitivity to ATP (Fig. 1), we have analyzed ATP-induced CD62L shedding, pore formation and PS exposure in recently activated B220⁻CD90⁺ T cells expressing CD69 (Fig. 2), which is the earliest surface marker expressed during T-cell activation (41). First, the number of cells expressing the homing receptor CD62L is significantly higher in CD69-negative T cell than in recently activated CD69⁺ T cells (24% vs. 12%; Fig. 2A). Unexpectedly, we found that ATP-treated T cells at the recently activated (CD69⁺) stage failed to cleave their CD62L molecules (Fig. 2A). The absence of ATP-mediated CD62L shedding was observed at both the percentages of CD62L⁺ T cells and the levels of CD62L membrane expression measured by the integrated mean of fluorescence (iMFI) (Fig. 2A). In contrast, the CD69-negative T-cell subset efficiently cleaves CD62L molecules in the presence of ATP. The absence of shedding in the CD69⁺ T-cell subset was not due to a defect in ADAM-17 activity since PMA, which induces CD62L shedding independently of the P2X7R pathway, induced a strong CD62L downregulation in both CD69⁻ and CD69⁺ T-cell subsets (Fig. 2A). Importantly, ATP-stimulated CD69⁺ T cells, although resistant to CD62L cleavage, efficiently form pore (8.87% vs. 50.87%, Fig. 2B) and externalize PS (17.59% vs. 32.88%, Fig 2C) as assessed by YO-PRO-1 uptake and Annexin V labeling, respectively. In contrast, pore formation and PS exposure were significantly less efficiently induced in the ATP-treated CD69-negative T-cell subset (Fig. 2B and 2C).

Taken all together, our results suggest a dissociation of ATP-induced CD62L shedding; pore formation and PS externalization in T cell according their stage of activation.

Effector/memory T lymphocytes are less sensitive to CD62L shedding but more sensitive to YO-PRO-1 uptake than naïve T lymphocytes

A previous study try to establish a relationship between membrane levels of CD45RB and CD44 differentiation marker expression and T cells sensitivity to ATP-induced pore formation, and found a higher uptake of fluorescent dye in memory T cells (CD45RB^{low}CD44^{high}) (42). In contrast, we show in Figure 1 that effector/memory CD45RB^{low} T cells displayed lower sensitivity to ATP-mediated CD62L shedding, PS exposure, pore formation and cell death than naïve CD45RB^{high} T cells. Therefore, we next compared the sensitivity to P2X7R activation of B220⁻CD90⁺ T cells expressing either low or high levels of the differentiation marker CD44 to distinguish between naïve T cells (CD44^{low}) and effector/memory T cells (CD44^{high}) (Fig. 3). The sensitivity to ATP of these two T-cell subsets was compared through the measurement of CD62L shedding, YO-PRO-1 uptake and PS exposure. Like recently activated CD69⁺ T cells (Fig. 2A), effector/memory T lymphocytes (CD44^{high}) were significantly less sensitive to ATP-induced CD62L shedding than naïve T lymphocytes (CD44^{low}) (Fig. 3A). In contrast, effector/memory T lymphocytes were significantly more sensitive to YO-PRO-1 uptake than naïve T lymphocytes (Fig. 3B). There was no significant difference between sensitivity to PS exposure between these two subsets of T lymphocytes (Fig. 3C). As expected, ATP-induced CD62L shedding, pore formation and PS externalization were absent in naïve (CD44^{low}) and effector/memory (CD44^{high}) B220⁻CD90⁺ T-cell subsets from P2X7KO B6 mice (Fig. 3). The absence of CD62L shedding in ATP-treated effector/memory T lymphocyte is not due to a defect in metalloproteases signaling since PMA treatment was able to induce CD62L shedding in these cells. Moreover, the shedding of CD62L by ATP in CD44^{low} naïve T lymphocytes, or by PMA in effector/memory T lymphocytes was prevented by the metalloprotease inhibitors GM6001 (Fig. 3D), in a similar dose dependent-manner.

CCR7 is a chemokine receptor involved in the homing of naïve and central memory T cells into lymphoid tissues. Thus, CCR7 membrane expression allows to distinguish between naïve and memory (CCR7⁺) T cells and effector (CCR7⁻) T cells. Therefore, we compared sensitivity to CD62L shedding in naïve CD44^{low} T cells and effector/memory CD44^{high} T cells according to their expression of CCR7, and found that effector/memory CD44^{high} T cells were significantly more resistant to CD62L shedding than CD44^{low} naïve T cells upon stimulation by ATP regardless to the expression levels of CCR7 (Supplementary Fig. 1).

Dissociation of ATP-induced CD62L shedding, YO-PRO-1 uptake and PS exposure in naïve and memory T cells during the early steps of T-cell activation

We next compared ATP sensitivity in naïve and memory CD44^{low}CD90⁺ T-cell subsets activated by antigen during primary or secondary immune responses, respectively, using membrane expression of CD44 and CD69 surface markers. To amplify numbers of recently activated CD69⁺ T cells, B6 mice were injected intravenously with 7 µg/g of T-cell mitogen ConA for 17 hours. ConA treatment induced T cell activation as evidenced by the increased of the percentages of CD69⁺ T cells (Supplementary Fig. 2B), especially the CD69⁺ CD44^{low} T-cell subset (Supplementary Table 2) without altering cell numbers (Supplementary Figure 2 A) or ratio of T cells to B cells (Supplementary Table 1). Effector/memory CD44^{high} T cells regardless to the expression of CD69 are less sensitive to CD62L shedding than their naïve CD44^{low} counterpart. ADAM-17 proteases are not defective in the effector/memory CD44^{high} T cells from because they cleaved CD62L when cells are treated with PMA (Fig. 4A). Like CD62L shedding, pore formation was more important in recently activated (CD69⁺) naïve CD44^{low} T cells (Fig. 4B). PS exposure was significantly higher in recently activated T cells (CD69⁺) at both naïve (CD44^{low}) and memory (CD44^{high}) stage compared to naïve and memory resting CD69⁻ T cells (Fig. 4C).

As expected, all T-cell subsets from P2X7R KO mice were resistant to ATP activation. These results confirm that P2X7R activities are dissociated in naïve or memory T cells during the early steps of T-cell activation.

Because P2X7R displays a low affinity to its ligand compared with other P2XR, we evaluated whether effector/memory CD44^{high} T cells (either CD69⁻ or CD69⁺), which were resistant to CD62L shedding upon stimulation with 0.5 mM of ATP, require an even higher dose of ATP to be stimulated. Indeed, we found that 1 mM ATP can trigger CD62L shedding in effector/memory CD44^{high} T lymphocytes (either CD69⁻ or CD69⁺) from B6 mice, but not from P2X7KO mice, although less efficiently than in CD44^{low} naïve T lymphocytes (either CD69⁻ or CD69⁺) (Fig. 5A and 5B).

Calcium signaling is required for P2X7-dependent pore formation and PS exposure, but not CD62L shedding, in recently activated CD69⁺ CD44^{low} naïve T lymphocyte

It has been reported that calcium acts as a second messenger for pore formation and PS externalization (42-46). Therefore, we analyzed if there is a requirement for calcium entry from the extracellular space and/or the intracellular stores to fully trigger P2X7-induced cellular activities in recently activated naïve CD69⁺ CD44^{low} T cells, which are among the most sensitive to ATP. In the presence of extracellular (EGTA) and/or intracellular (BAPTA-AM) calcium chelator, ATP-induced pore formation and PS exposure, but not CD62L shedding, were significantly reduced in recently activated naïve CD69⁺ CD44^{low} T cells stimulated by (Fig. 6A, 6B and 6C).

Regulatory CD45RB^{low} CD4⁺ T cells display high sensitivity to ATP stimulation

The activated CD45RB^{low} CD4⁺ T-cell subset encompasses regulatory and conventional T cells.(47) Different behaviors of Tconv and Tregs toward ATP stimulation have been reported previously (32, 33). While one report concluded that

Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs were markedly more sensitive to ATP-induced PS exposure and cell death than CD25⁻CD4⁺ Tconvs (32), another reported a similar susceptibility to ATP-induced PS exposure and cell death between CD4⁺ Tconvs and Tregs provided, however, that both T-cell subsets expressed low levels of CD45RB (33). To clarify these contradictory results, we have compared the sensitivity to ATP of Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs, known to be CD45RB^{low}, and B220⁻CD4⁺ Tconvs (either CD45RB^{low} or CD45RB^{high}) (Fig. 7). Due to the cell permeabilization step required for detection of the nuclear transcription factor Foxp3, ATP-induced pore formation or cell death cannot be evaluated using fluorescent probes. Therefore, ATP-induced T cell death is determined by flow cytometry using forward (FSC) and side (SSC) scatters parameters since dying cells have a lower FSC and a higher SSC than living cells. Spleen cells from B6 and B6P2X7R KO mice were stimulated with 1 mM ATP for 4 h, and the percentages of living cells (FSC^{high}SSC^{low}) in the CD4⁺ Tregs and Tconvs subpopulations was quantified by flow cytometry (Fig. 7A). As expected, CD4⁺ T cells from B6P2X7R KO mice were resistant to ATP-induced cell death (data not shown). As observed by Aswad et al (32), ATP-treated Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs were highly sensitive to P2X7R-mediated cell death (59% dead cells), and significantly more than whole CD4⁺ T cells (32% dead cells), whereas activated CD4⁺ Tconvs (Foxp3⁻CD25⁺) were totally unhurt after ATP treatment (Fig. 7A). In parallel, the sensitivity of CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ Tregs to P2X7R stimulation was compared to that of activated CD45RB^{low}CD25⁻CD4⁺ Tconvs (Fig. 7C). As observed by Taylor et al. (33), CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ Tregs and activated CD45RB^{low}CD25⁻CD4⁺ Tconvs displayed a similar low-sensitivity to P2X7R-mediated PS exposure. In contrast, P2X7R-mediated pore formation and cell death were significantly higher (2.5- and 2-fold increase, respectively) in CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ Tregs than in activated CD45RB^{low}CD25⁻CD4⁺ Tconvs (Fig. 7C) and even when compared to naïve CD45RB^{high}CD25⁻CD4⁺ Tconvs. Altogether, we show that Tregs are very sensitive to

P2X7R stimulation, especially cell-death, and found a significant increase of the percentages of CD25⁺CD4⁺ Tregs (either CD45RB^{low} or Foxp3⁺) in B6P2X7KO mice (data not shown). Since CD45RB^{low}CD4⁺ Tconvs expressed similar amounts of CD45RB than Tregs, but are not as responsive to P2X7R stimulation, we suggest that CD45RB expression level is not essential for P2X7 activity, and other signaling proteins are involved.

P2X7R membrane expression in Tregs and conventional T cells at different activation stage

P2X7R plasma membrane expression was quantified on Tregs and T convs using a rabbit polyclonal anti-P2X7R serum and flow cytometry (Fig. 8). The staining patterns obtained with cells from P2X7RKO mice were used to set the background fluorescence, and P2X7R membrane expression was expressed as the fold of MFI obtained in wild type T cells relative to MFI in P2X7RKO T cells (Δ MFI). P2X7R was expressed at a higher level on recently activated CD69⁺ T cells compared to naïve (CD44^{low}) or effector/memory (CD44^{high}) T cells (Fig. 8A and 8B), similar or even slightly higher than in CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (Fig. 8C), which are highly sensitive to ATP (Fig. 7). The two peaks in the histogram of P2X7 expression on CD69⁺ T cells (Fig. 8A) correspond most probably to the levels of P2X7 expression on activated naïve (CD44^{low}) and memory (CD44^{high}) T cells. Activation marker CD25 shows a latter expression than CD69. Interestingly, P2X7 expression on Tconvs (Foxp3⁻) expressing CD25 (Fig. 8C) are significantly lower than on CD69⁺ Tconvs.

Discussion

High membrane expression of CD45RB is a characteristic of naïve T cells and some reports have suggested the existence of a negative correlation between CD45RB expression and P2X7R activity (34, 42) in Tconvs. Subsequently, they have shown a similar level of P2X7R-mediated PS exposure and cell death in CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ Tregs and CD45RB^{low} CD25⁻CD4⁺ Tconvs (33). Contradictory results have been reported about the sensitivity of CD4⁺ Tregs to ATP stimulation. Indeed, FoxP3⁺CD4⁺Tregs were shown highly sensitive to P2X7R-mediated PS exposure and cell death compared to CD4⁺ Tconvs (32). In the present study, we have tried to resolve the discrepancy between these reports, by analyzing the correlation between P2X7R functionality and CD45RB expression. On one hand, we have shown herein that the use of the anti-CD45RB mAb to control CD45RB expression levels in Tregs and Tconvs may be inappropriate because it recognizes an epitope shared by both the CD45RB and B220 molecules, and we previously reported that B220-expressing effector T cells were totally refractory to ATP stimulation (35). Therefore, we suggest that Taylor et coll. (33) assessed P2X7R activity in a pool of B220⁺ and CD45RB^{high} T cells. Thus, in our experiments, when studying CD45RB^{high} T cells, P2X7R-induced cellular activities have been systematically analyzed in the gated B220⁻ T cells. In that way, our results show that CD45RB^{high}CD4⁺ Tconvs are significantly more sensitive to ATP-mediated PS exposure, pore formation and/or cell death than CD45RB^{low}CD4⁺ Tconvs. Considering that CD45RB^{low}CD4⁺ Tconvs are activated T cells, we have investigated the role of T-cell activation and differentiation in the downmodulation of P2X7R activities. Thus, we have analyzed naïve, recently activated, and effector/memory T cells for their sensitivity to ATP stimulation, and found that ATP-dependent cellular activities are dissociated and executed differently according to the stage of T-lymphocyte activation and differentiation. Thus, our results show that 1) CD62L shedding occurs efficiently in 500 μM ATP-treated naïve and recently activated naïve T cells (shedding up to 50% of basal CD62L expression); 2) CD62L shedding

occurs significantly less efficiently in effector/memory CD44^{high} T lymphocyte (either CD69⁻ or CD69⁺) even at very high doses of ATP (up to 4 mM); 3) resistance of CD44^{high} T cells ATP-induced CD62L shedding is not due to ADAM 17 deficiency; 4) recently activated CD69⁺ naïve CD44^{low} T cells form pore significantly more efficiently than the other subsets; 5) recently activated CD69⁺ (either in primary or secondary immune responses) are significantly more responsive to ATP-mediated PS exposure. These results indicate that P2X7R cellular activities are dissociated upon T-cell activation and differentiation, and suggest that they are regulated by different signaling pathways. Calcium influx was reported to be involved in pore formation, PS exposure and cell death in both T lymphocytes and thymocytes (42, 44). Consistent with these findings, we show herein that calcium chelators impaired ATP-induced pore formation and PS exposure in recently activated CD69⁺ CD44^{low} T lymphocytes, but not CD62L shedding. The cytoplasmic tail of P2X7R is important for calcium uptake, pore formation and PS exposure (48) and could be responsible for the dependence of pore formation and PS exposure to calcium entry from the extracellular space and/or the intracellular stores.

The Treg subpopulation is phenotypically and functionally diverse and includes Qa-1/HLA-E restricted CD8⁺ Tregs (49), natural killer T cells (NKT)(50), and NK1.1⁻TCRa/b⁺CD4⁻CD8⁻ double negative (DN) Tregs (51, 52). Some DN Tregs express high levels of the isoform CD45RABC (or B220) (53, 54). CD4⁺ Tregs suppress immune responses by cell contact-dependent mechanisms as well as by secreting immunosuppressive cytokines. NKT cells (50) and DN Tregs suppress T-cell responses by killing CD4⁺ and CD8⁺ effector T cells with the same TCR specificity through Fas/Fas ligand interactions(51). B220⁺ DN T cells can also suppress T cell proliferation by a mechanism that involves inhibition of IL-2 and its high affinity receptor CD25 (53). CD25⁺CD4⁺ Tregs, which have been defined in our study by Foxp3⁺ or CD45RB^{low}, express high levels of P2X7R on the plasma membrane (data not shown). In addition,

CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ Tregs are more sensitive to ATP stimulation than CD45RB^{low} activated Tconv and even than CD45RB^{high} T cells. Therefore, as observed by Aswad et al (32), our results indicate that CD4⁺ Tregs are much more sensitive to ATP-stimulation than CD4⁺ Tconv. Thus, we show herein that the numbers of CD4⁺ Tregs are significantly enhanced in the spleen of B6P2X7RKO mice, suggesting that ATP-stimulation of P2X7R may regulate the numbers of CD4⁺ Tregs *in vivo*. Tregs are essential for the maintenance of peripheral tolerance, preventing the appearance of autoimmune disorders. While CD4⁺ Tregs are present in the immune repertoire before the activation of T cells by antigen, CD8⁺ Tregs and B220⁺ DN Tregs differentiate into effector cells during a primary immune response (49). Since we reported that effector T cells expressing the B220 isoform of CD45 at the plasma membrane are totally resistant to ATP stimulation (35), we hypothesize that B220⁺ DN Tregs also possess reduced P2X7R activity and membrane expression since they differentiated upon T cell activation. Unfortunately, CD8⁺ Tregs are difficult to identify unambiguously, and therefore we could not test the activity of P2X7R in this Treg subset. We have observed, however, that whole CD8⁺ T-cell population expresses a lower level of P2X7R membrane expression than CD4⁺ T cells (unpublished data). Levels of ATP are very high in sites of inflammation due to the presence of injured cells (55). Since P2X7R displays a low affinity for ATP compared with other P2X receptors, we propose a model whereby the various Treg subsets express different levels of cell-surface P2X7R according to their probability to encounter high levels of ATP. Furthermore, fully activated T cells cannot die by the ATP/P2X7R pathway, which could constitute a survival mechanism by which activated T cells can exert their effector functions at sites of inflammation. Consequently, P2X7R-mediated T cell homeostasis controls the expansion of effector T cells as well as types of Treg subsets present at inflammatory sites.

References

1. North, R. A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013.
2. Coddou, C., Z. Yan, T. Obsil, J. P. Huidobro-Toro, and S. S. Stojilkovic. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63:641.
3. Wiley, J. S., R. Chen, M. J. Wiley, and G. P. Jamieson. 1992. The ATP4- receptor-operated ion channel of human lymphocytes: inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by extracellular sodium ions. *Archives of biochemistry and biophysics* 292:411.
4. Mackenzie, A. B., M. T. Young, E. Adinolfi, and A. Surprenant. 2005. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem* 280:33968.
5. Coutinho-Silva, R., P. M. Persechini, R. D. Bisaggio, J. L. Perfettini, A. C. Neto, J. M. Kanellopoulos, I. Motta-Ly, A. Dautry-Varsat, and D. M. Ojcius. 1999. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* 276:C1139.
6. Ferrari, D., M. Los, M. K. Bauer, P. Vandenabeele, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. 1999. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* 447:71.
7. Humphreys, B. D., J. Rice, S. B. Kertesy, and G. R. Dubyak. 2000. Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 275:26792.
8. Auger, R., I. Motta, K. Benihoud, D. M. Ojcius, and J. M. Kanellopoulos. 2005. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 280:28142.
9. Jun, D. J., J. Kim, S. Y. Jung, R. Song, J. H. Noh, Y. S. Park, S. H. Ryu, J. H. Kim, Y. Y. Kong, J. M. Chung, and K. T. Kim. 2007. Extracellular ATP mediates

- necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282:37350.
10. Adinolfi, E., M. G. Callegari, M. Cirillo, P. Pinton, C. Giorgi, D. Cavagna, R. Rizzuto, and F. Di Virgilio. 2009. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* 284:10120.
 11. Adinolfi, E., M. Cirillo, R. Woltersdorf, S. Falzoni, P. Chiozzi, P. Pellegatti, M. G. Callegari, D. Sandona, F. Markwardt, G. Schmalzing, and F. Di Virgilio. 2010. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* 24:3393.
 12. Colomar, A., V. Marty, C. Medina, C. Combe, P. Parnet, and T. Amedee. 2003. Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J Biol Chem* 278:30732.
 13. Kahlenberg, J. M., and G. R. Dubyak. 2004. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1100.
 14. 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 P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276:125.
 15. 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.
 16. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176:3877.

17. Di Virgilio, F. 2007. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28:465.
18. McDonald, B., K. Pittman, G. B. Menezes, S. A. Hirota, I. Slaba, C. C. Waterhouse, P. L. Beck, D. A. Muruve, and P. Kubes. 2010. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330:362.
19. Lammas, D. A., C. Stober, C. J. Harvey, N. Kendrick, S. Panchalingam, and D. S. Kumararatne. 1997. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* 7:433.
20. Coutinho-Silva, R., L. Stahl, M. N. Raymond, T. Jungas, P. Verbeke, G. Burnstock, T. Darville, and D. M. Ojcius. 2003. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19:403.
21. Gu, B., L. J. Bendall, and J. S. Wiley. 1998. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92:946.
22. Le Gall, S. M., P. Bobé, K. Reiss, K. Horiuchi, X. D. Niu, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C. P. Blobel. 2009. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20:1785.
23. Suzuki, T., I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue, and Y. Nakata. 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24:1.
24. Garbers, C., N. Janner, A. Chalaris, M. L. Moss, D. M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John, and J. Scheller. 2011. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 286:14804.

25. Delarasse, C., R. Auger, P. Gonnord, B. Fontaine, and J. M. Kanellopoulos. 2010. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*.
26. Loomis, W. H., S. Namiki, R. S. Ostrom, P. A. Insel, and W. G. Junger. 2003. Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 278:4590.
27. Schenk, U., A. M. Westendorf, E. Radaelli, A. Casati, M. Ferro, M. Fumagalli, C. Verderio, J. Buer, E. Scanziani, and F. Grassi. 2008. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1:ra6.
28. Yip, L., T. Woehrle, R. Corriden, M. Hirsh, Y. Chen, Y. Inoue, V. Ferrari, P. A. Insel, and W. G. Junger. 2009. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23:1685.
29. Atarashi, K., J. Nishimura, T. Shima, Y. Umesaki, M. Yamamoto, M. Onoue, H. Yagita, N. Ishii, R. Evans, K. Honda, and K. Takeda. 2008. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 455:808.
30. Schenk, U., M. Frascoli, M. Proietti, R. Geffers, E. Traggiai, J. Buer, C. Ricordi, A. M. Westendorf, and F. Grassi. 2011. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* 4:ra12.
31. Heiss, K., N. Janner, B. Mahnss, V. Schumacher, F. Koch-Nolte, F. Haag, and H. W. Mittrucker. 2008. High sensitivity of intestinal CD8+ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses. *J Immunol* 181:3861.
32. Aswad, F., H. Kawamura, and G. Dennert. 2005. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* 175:3075.

33. Taylor, S. R., D. R. Alexander, J. C. Cooper, C. F. Higgins, and J. I. Elliott. 2007. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J Immunol* 178:3474.
34. Elliott, J. I., A. Surprenant, F. M. Marelli-Berg, J. C. Cooper, R. L. Cassady-Cain, C. Wooding, K. Linton, D. R. Alexander, and C. F. Higgins. 2005. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* 7:808.
35. Le Gall, S. M., J. Legrand, M. Benbijja, H. Safya, K. Benihoud, J. M. Kanellopoulos, and P. Bobé. 2012. Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* 7:e52161.
36. Renno, T., M. Hahne, J. Tschopp, and H. R. MacDonald. 1996. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* 183:431.
37. Renno, T., A. Attinger, D. Rimoldi, M. Hahne, J. Tschopp, and H. R. MacDonald. 1998. Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* 28:540.
38. Bleesing, J. J., M. R. Morrow, G. Uzel, and T. A. Fleisher. 2001. Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* 213:72.
39. Hermiston, M. L., Z. Xu, and A. Weiss. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21:107.
40. McNeill, L., R. L. Cassady, S. Sarkardei, J. C. Cooper, G. Morgan, and D. R. Alexander. 2004. CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol Lett* 92:125.

41. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26:136.
42. Chused, T. M., S. Apasov, and M. Sitkovsky. 1996. Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation. *J Immunol* 157:1371.
43. Lajdova, I., D. Chorvat, Jr., V. Spustova, and A. Chorvatova. 2004. 4-Aminopyridine activates calcium influx through modulation of the pore-forming purinergic receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Can J Physiol Pharmacol* 82:50.
44. Courageot, M. P., S. Lepine, M. Hours, F. Giraud, and J. C. Sulpice. 2004. Involvement of sodium in early phosphatidylserine exposure and phospholipid scrambling induced by P2X7 purinoceptor activation in thymocytes. *The Journal of biological chemistry* 279:21815.
45. Faria, R. X., F. P. Defarias, and L. A. Alves. 2005. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C260.
46. Schachter, J., A. P. Motta, A. de Souza Zamorano, H. A. da Silva-Souza, M. Z. Guimaraes, and P. M. Persechini. 2008. ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci* 121:3261.
47. Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1994. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* 179:589.

48. Adriouch, S., C. Dox, V. Welge, M. Seman, F. Koch-Nolte, and F. Haag. 2002. Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *Journal of immunology* 169:4108.
49. Jiang, H., and L. Chess. 2006. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 354:1166.
50. Liu, Y., A. Teige, E. Mondoc, S. Ibrahim, R. Holmdahl, and S. Issazadeh-Navikas. 2010. Endogenous collagen peptide activation of CD1d-restricted NKT cells ameliorates tissue-specific inflammation in mice. *J Clin Invest*.
51. Thomson, C. W., B. P. Lee, and L. Zhang. 2006. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol Res* 35:163.
52. Martina, M. N., S. Noel, A. Saxena, H. Rabb, and A. R. Hamad. 2014. Double Negative (DN) alpha beta T Cells: misperception and overdue recognition. *Immunology and cell biology*.
53. Hamad, A. R., A. S. Mohamood, C. J. Trujillo, C. T. Huang, E. Yuan, and J. P. Schneck. 2003. B220+ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 171:2421.
54. Zhang, D., W. Yang, N. Degauque, Y. Tian, A. Mikita, and X. X. Zheng. 2007. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood* 109:4071.
55. Scheuplein, F., N. Schwarz, S. Adriouch, C. Krebs, P. Bannas, B. Rissiek, M. Seman, F. Haag, and F. Koch-Nolte. 2009. NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* 182:2898.

Figure legends**Figure 1. Anti-CD45RB antibodies cannot distinguish between CD45RB and CD45RABC isoforms.**

COS-7 fibroblasts were transiently transfected with a pCDEF3 expression vector containing CD45RABC cDNA were stained with FITC-conjugated anti-CD45RA, PE-conjugated anti-CD45RB, APC-conjugated anti-CD45RC and PE Cy5.5-conjugated anti-CD45RABC, and analyzed by flow cytometry. **A)** R1 and R2 gates delineate B220-negative and B220⁺ COS-7 cells, respectively. The table gives the percentages of B220⁺ COS-7 cells before and after transfection. **B)** Expression of CD45RA, CD45RB or CD45RC in COS-7 fibroblast gated on R1. Histograms obtained with anti-CD45RA, anti-CD45RB or anti-CD45RC mAb (-) are overlaid on histograms obtained with isotype control (- - -). At least 20,000 events were analyzed for each sample.

Figure 2. P2X7-dependent CD62L shedding, pore formation and PS exposure in CD69⁻ and CD69⁺ T lymphocytes

Spleen cells from 3 to 12-mo-old B6 mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M ATP or 25 ng/ml PMA for 30 min at 37°C with 5% CO₂. After washing, cells were stained with fluorescent-conjugated anti-CD90, anti-B220, anti-CD69 mAbs and either anti-CD62L mAb or Annexin V to assess CD62L shedding and PS exposure, respectively, by flow cytometry. **A)** Right panel: dot plot shows CD62L shedding in CD69⁻ and CD69⁺ T lymphocytes. Left panel: histogram shows ratio of integrated mean of fluorescence (iMFI) \pm SE (n = 3 to 5 mice) for CD62L between ATP- or PMA-stimulated cells and unstimulated cells. Integrated MFI is calculated by multiplying the frequency of positive cells by the MFI of CD62L. **B)** Right panel: Dot plot shows pore formation in CD69⁻ and CD69⁺ T lymphocytes left unstimulated or stimulated with ATP or PMA, as measured by the uptake of fluorescent probe YO-PRO-1. Left panel:

RESULTS

histogram shows normalized mean of fluorescence (nMFI) \pm SE (n = 3 to 4 mice) for YO-PRO-1⁺ after treatment with ATP or PMA. Normalized MFI is calculated by subtracting YO-PRO-1 background uptake in unstimulated cells from YO-PRO-1 uptake in ATP- or PMA-treated cells. YO-PRO-1 was added to the cells prior to stimulation with ATP or PMA. C) Right panel: dot plot shows PS exposure in CD69⁻ or CD69⁺ T lymphocytes left unstimulated or stimulated with ATP or PMA, as measured by Annexin V staining. Left panel: histogram shows nMFI \pm SE (n = 7 mice) for Annexin V after treatment with ATP or PMA. Numbers reported in dot plots indicate the percentage of CD62L⁺, YO-PRO-1⁺ or Annexin V⁺ cells in gated CD90⁺ B220⁻ T lymphocytes (either CD69⁻ or CD69⁺). Asterisks denote statistically significant differences (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) between ATP-stimulated or PMA-stimulated and unstimulated groups.

Figure 3. P2X7-dependent CD62L shedding, pore formation and PS exposure in CD44^{low} and CD44^{high} T lymphocytes

Spleen cells from 3 to 12-mo-old B6 wild type or P2X7KO mice were incubated with 0, 25, 50 or 100 μ M of metalloproteases inhibitor GM6001 prior to stimulation with 500 μ M ATP or 40nM PMA for 30 min at 37°C with 5% CO₂. After washing, cells were stained with fluorescent-conjugated anti-CD90, anti-B220, anti-CD44 mAbs and either anti-CD62L mAb or Annexin V to assess CD62L shedding or PS exposure, respectively, by flow cytometry. A) Histogram shows ratio of the integrated mean of fluorescence (iMFI) \pm SE (n = 3 to 14 mice) for CD62L between ATP- or PMA-stimulated cells and unstimulated cells. The integrated MFI is calculated by multiplying the frequency of positive cells by the MFI of CD62L. B) Histogram shows normalized mean of fluorescence (nMFI) \pm SE (n = 3 mice) for YO-PRO-1⁺ after treatment with ATP or PMA. The normalized MFI is calculated by subtracting YO-PRO-1 background uptake in unstimulated cells from YO-PRO-1 uptake in ATP- or PMA-treated cells. YO-PRO-1 was

RESULTS

added to the cells prior to stimulation with ATP or PMA. **C)** Histogram shows nMFI for Annexin V \pm SE (n =3 mice) after treatment with ATP or PMA. **D)** Histogram shows ratio to initial percentage of CD62L⁺ in CD44^{low} T cells \pm SE (n = 3-4 mice). Plots in A, B, C and D were gated on CD90⁺ B220⁻ T cells. Asterisks denote statistically significant (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) differences between ATP-stimulated and unstimulated groups; *ns* = non-significant.

Figure 4. P2X7-dependent CD62L shedding, pore formation and PS exposure in different subsets of T lymphocytes

Spleen cells from 3 to 12-mo-old B6 wild type or P2X7KO mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M ATP for 30 min at 37°C with 5% CO₂. After washing, cells were stained with fluorescent-conjugated anti-CD90, anti-B220, anti-CD69 or anti-CD44 mAbs and either anti-CD62L mAb or Annexin V to assess CD62L shedding and PS exposure, respectively, by flow cytometry **A)** Histogram shows ratio of the integrated mean of fluorescence (iMFI) \pm SE (n = 5 to 20 mice) for CD62L between ATP- or PMA-stimulated cells and unstimulated cells. The integrated MFI is calculated by multiplying the frequency of positive cells by the MFI of CD62L. **B)** Histogram shows normalized mean of fluorescence (nMFI) \pm SE (n = 4 to 7 mice) for YO-PRO-1⁺ after treatment with ATP or PMA. The normalized MFI is calculated by subtracting YO-PRO-1 background uptake in unstimulated cells from YO-PRO-1 uptake in ATP- or PMA-treated cells. YO-PRO-1 was added to the cells before stimulation with ATP or PMA. **C)** Histogram shows nMFI \pm SE (n =3 mice) for Annexin V after treatment with ATP or PMA. Plots in A, B and C were gated on CD90⁺ B220⁻ T cells. First two bars from each histogram show cellular activity in whole CD90⁺ B220⁻ T cells. Asterisks denote statistically significant (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) differences between ATP-stimulated and unstimulated groups.

Figure 5: Higher dose of ATP is required to shed CD62L molecules on effector/memory T lymphocytes

Spleen cells from 3 to 12-mo-old B6 wild type or P2X7KO mice were incubated with 0, 0.5, 1, 2 or 4 mM ATP for 30 min at 37°C with 5% CO₂. After washing, cells were stained with fluorescent-conjugated anti-CD90, anti-B220, anti-CD44 and anti-CD69, and anti-CD62L mAbs to assess CD62L shedding by flow cytometry. **A)** Histogram shows ratio of the percentages of CD62L \pm SE (n = 5 to 9 mice) between ATP-stimulated cells and unstimulated cells from B6 wild type mice **B)** Histogram shows ratio of the percentages of CD62L \pm SE (n = 3 to 4 mice) between ATP-stimulated cells and unstimulated cells from P2X7KO mice. Histograms were gated on CD90⁺ B220⁻ T cells. First four bars from each histogram show cellular activity in whole CD90⁺ B220⁻ T cells. Asterisks denote statistically significant (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) differences between ATP-stimulated groups.

Figure 6. Calcium signaling is involved in P2X7-dependent pore formation and PS externalization in recently activated CD69⁺ CD44^{low} T lymphocytes

Spleen cells from 3 to 12-mo-old B6 wild type were left untreated or treated with 5 μ M KN-62 for 30 min. Cells were preincubated with 500 μ M EGTA, 10 μ M BAPTA-AM or both for 30 min at 37°C with 5% CO₂. In some experiments, cells were incubated with Fluo-4-AM for 50 min at room temperature. In others, YO-PRO 1 was added prior to stimulation with ATP. After washing, all cells were stained with fluorescent-conjugated anti-CD90, anti-B220, anti-CD69 and anti-CD44 mAbs and analyzed in the gated CD90⁺ B220⁻ CD69⁺ CD44^{low or high} T-cell subpopulation by flow cytometry. **A)** Histogram shows ratio of the percentages of CD62L \pm SE (n = 4 to 9 mice) between ATP-stimulated cells and unstimulated cells from B6 wild type mice in the presence of KN-62, EGTA or

BAPTA-AM. **B)** Histogram shows the percentages \pm SE ($n = 3$ mice) of YO-PRO-1⁺ cells after treatment with ATP in the presence of EGTA, BAPTA-AM or both. **C)** Histogram shows the percentages \pm SE ($n = 3-4$ mice) of Annexin V⁺ cells after treatment with ATP in the presence of EGTA, BAPTA-AM or both. Histograms were gated on CD90⁺ B220⁻ T cells. First four bars from each histogram show cellular activity in whole CD90⁺ B220⁻ T cells. Asterisks denote statistically significant (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) differences between ATP-stimulated groups.

Figure 7. CD4⁺ Tregs are more sensitive to ATP-induced cell death than CD4⁺ Tconvs. Spleen cells from B6 mice ($n = 3$ mice/group) were either left unstimulated or stimulated with 1 mM ATP for 4 h (A, B) or 45 min (B). **A)** Cells were subsequently stained with anti-CD90, anti-CD4, anti-CD25 and anti-Foxp3 mAb. At least 5,000 CD4⁺ Tregs or CD4⁺ Tconvs were analyzed for each sample. Bars correspond to the mean percentages \pm SE ($n = 3$) of living (FSC^{high}SSC^{low}) Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs, whole CD4⁺Tconvs and Foxp3⁻CD25⁺CD4⁺ Tconvs either left unstimulated (\square) or stimulated (\blacksquare) with 1mM ATP. Asterisks denote statistically significant differences (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$) between ATP-stimulated and unstimulated groups. **B)** Spleen cells from B6 were stained with anti CD4, anti-CD25 and anti-CD45RB mAb and either AnnexinV, YO-PRO-1 and 7AAD to assess PS exposure, pore formation and cell-death in CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺ Tregs and CD45RB^{low}CD25⁻CD4⁺ Tconvs. **C)** P2X7R expression was analyzed using an anti-P2X7R antiserum (1:100) in FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs, CD45RB^{low}CD25⁺CD4⁺Tregs and whole CD4⁺Tconvs. Histograms for P2X7R-stained cells from B6 mice (open histogram) are overlaid on histograms obtained with their counterparts from B6P2X7R^{-/-} mice (shaded histogram). The histograms are representative of at least 3 independent experiments. Percents of P2X7R-positive cells are subtracted by the non-specific P2X7R positive cell percent in B6P2X7R^{-/-} mice.

Figure 8. P2X7R expression on Tregs and Tconv subsets. FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs as well as naïve (CD45RB^{high} CD44^{low}), activated (CD69⁺ or CD25⁺) and effector/memory (CD44^{high}) Tconvs gated on B220⁻CD90⁺ from wild type and P2X7KO B6 mice were examined for P2X7R expression by flow cytometry using rabbit polyclonal anti-P2X7 antiserum (1:100) and anti-CD90 and anti-B220 mAbs as well as anti-CD45RB, anti-CD25, anti-CD69 or anti-CD44 mAb. Histograms for P2X7R-staining on wild type T cells (open histograms) are overlaid on histograms for P2X7R-staining on P2X7KO T cells (shaded histograms). The histograms are representative of at least 6 individual mice. P2X7R expression is calculated as the fold of MFI obtained from P2X7R staining from B6 T-cells subsets over MFI from P2X7KO T cells (Δ MFI).

Supplementary Figures

Figure 1. P2X7-dependent CD62L shedding in naïve (CCR7⁺), effector (CCR7⁻) and memory (CCR7⁺) T cells. Spleen cells from 3 to 12-mo-old B6 wild type or P2X7KO mice were either left unstimulated or stimulated with 0.5 or 1.5 mM ATP for 30 min at 37°C with 5% CO₂. After washing, cells were fixed for 15 min at 4°C, and then stained with anti-CCR7 for 30 min at 37°C with 5% CO₂. Finally, cells were stained with fluorescent-conjugated anti-CD90, anti-B220 or anti-CD44 and anti-CD62L mAb for 30 min at 4°C to assess CD62L expression by flow cytometry. The histogram shows percentage \pm SE (n = 5 to 20 mice) of CD62L in unstimulated and ATP stimulated cells. Analyses were done in CD90⁺ B220⁻ T cells gate. Asterisks denote statistically significant (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) differences between ATP-stimulated groups; *ns* = non-significant.

Figure 2. Recently activated CD69⁺ T cells induced in mice by mitogen ConA injection. Wild-type and P2X7KO mice were injected intravenously with either 7 µg/g body weight of sterile ConA or 200 µl of sterile PBS. Mice were sacrificed 17 h later, and cell suspensions were prepared from the spleen. After washing, cells were stained with anti-CD90, anti-B220 and anti-CD69 mAbs, and analyzed on gated CD90⁺ B220⁻ T cells by flow cytometry. **A)** Histogram shows total spleen cell numbers in mice injected either with PBS or Con A (n = 8-14 mice). **B)** Histogram shows the percentages of recently activated CD69⁺ T cells in mice injected either with PBS or Con A (n = 8-13 mice).

Figure 1. Anti-CD45RB antibodies cannot distinguish between CD45RB and CD45RABC isoforms.

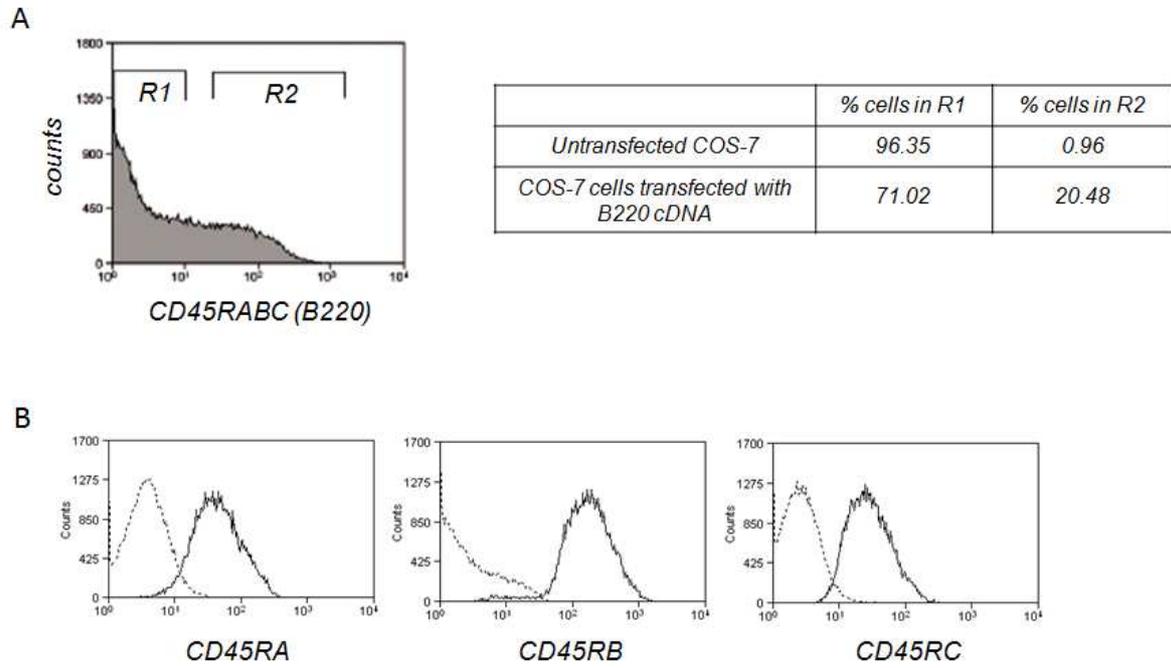


Figure 2. P2X7-dependent CD62L shedding, pore formation and PS exposure in CD69⁻ and CD69⁺ T lymphocytes

RESULTS

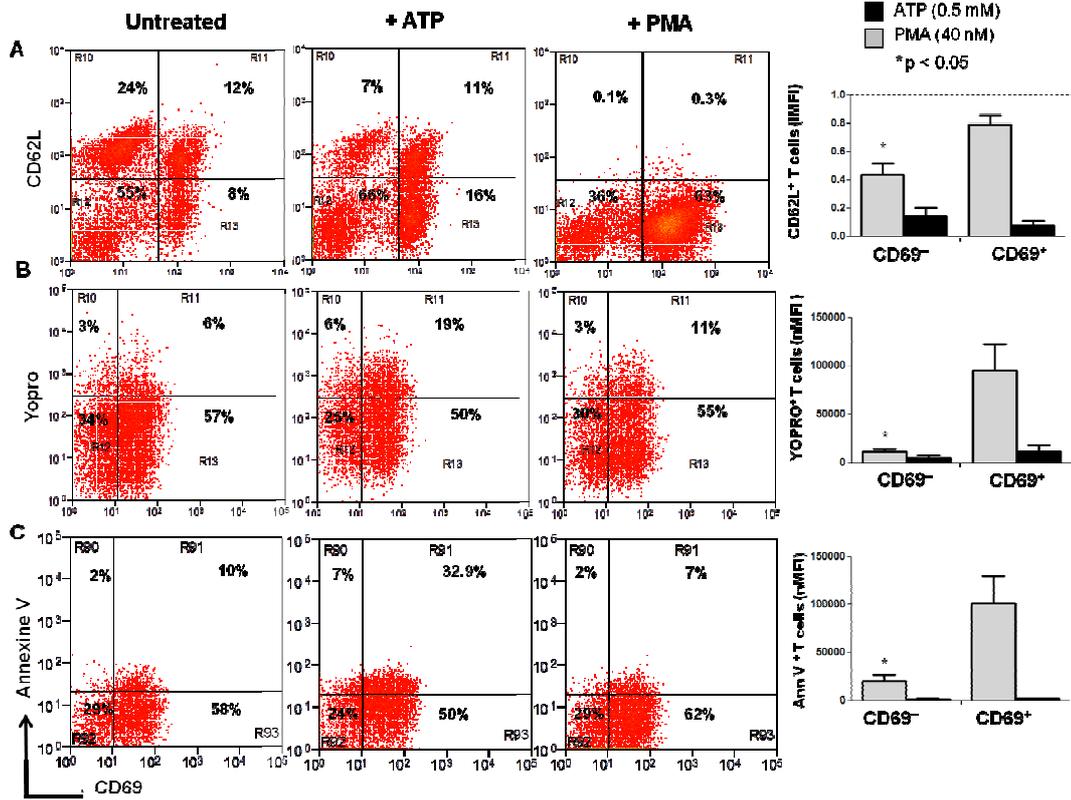


Figure 3. P2X7-dependent CD62L shedding, pore formation and PS exposure in CD44^{low} and CD44^{high} T lymphocytes

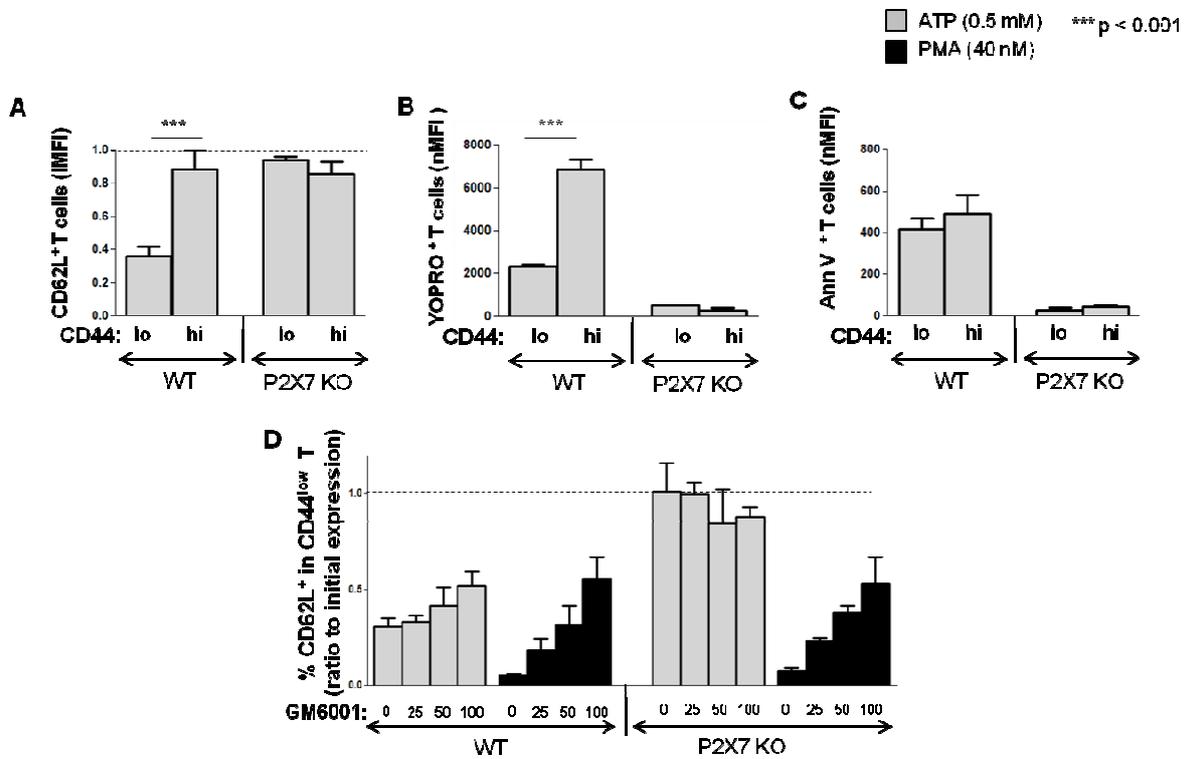


Figure 4. P2X7-dependent CD62L shedding, pore formation and PS exposure in different subsets of T lymphocytes

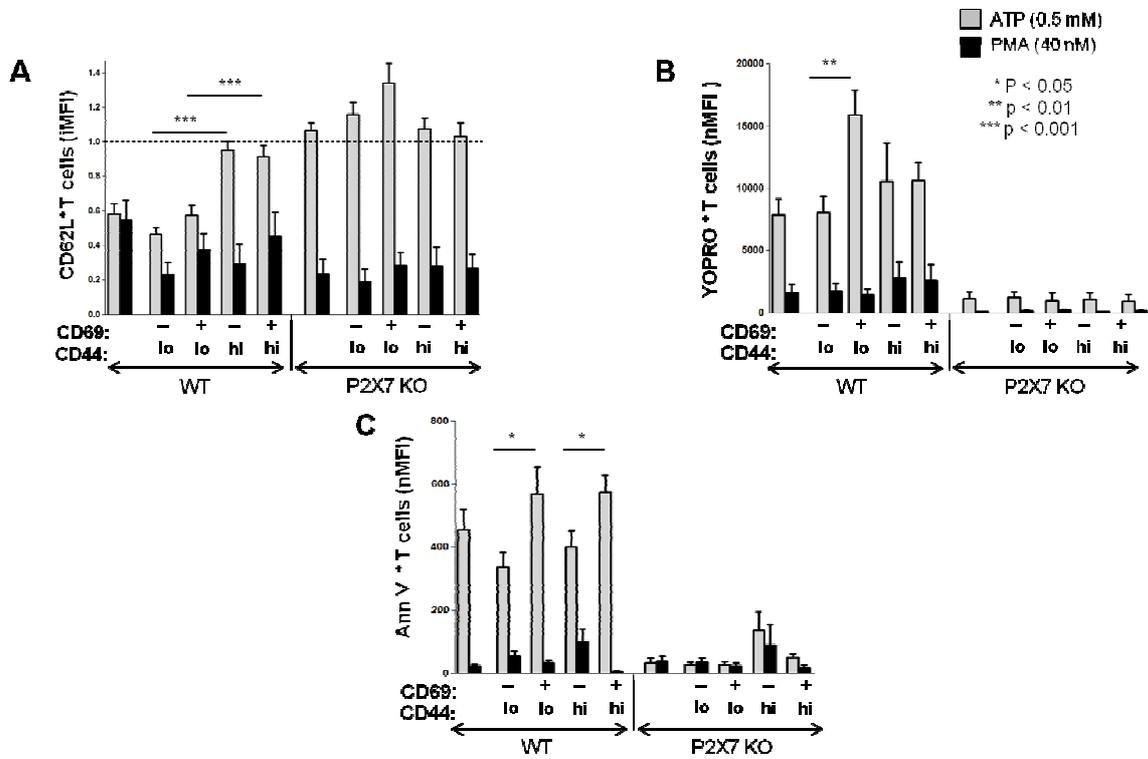


Figure 5: Higher dose of ATP is required to shed CD62L molecules on effector/memory T lymphocytes

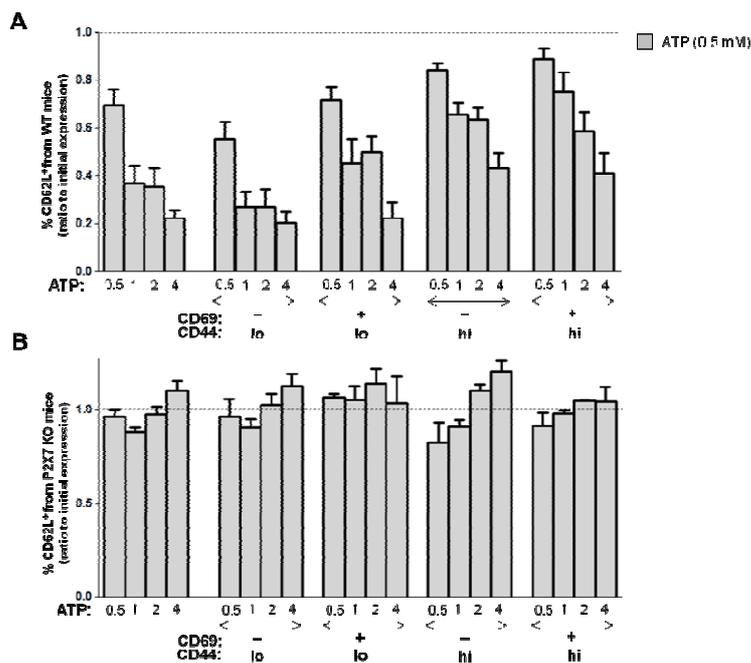


Figure 6. Calcium signaling is involved in P2X7-dependent pore formation and PS externalization in recently activated CD69⁺ CD44^{low} T lymphocytes

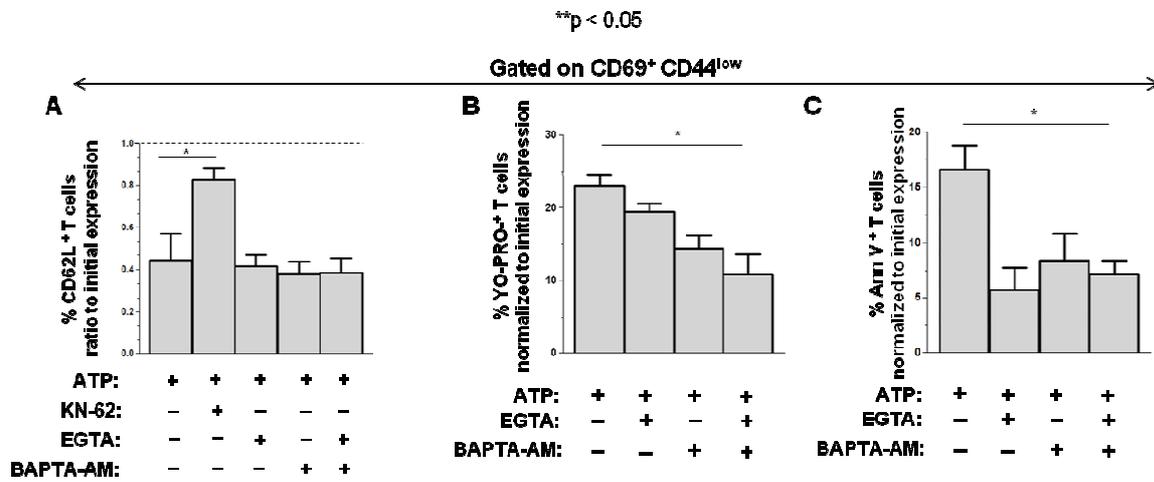


Figure 7. CD4⁺ Tregs are more sensitive to ATP-induced cell death than CD4⁺ Tconvs.

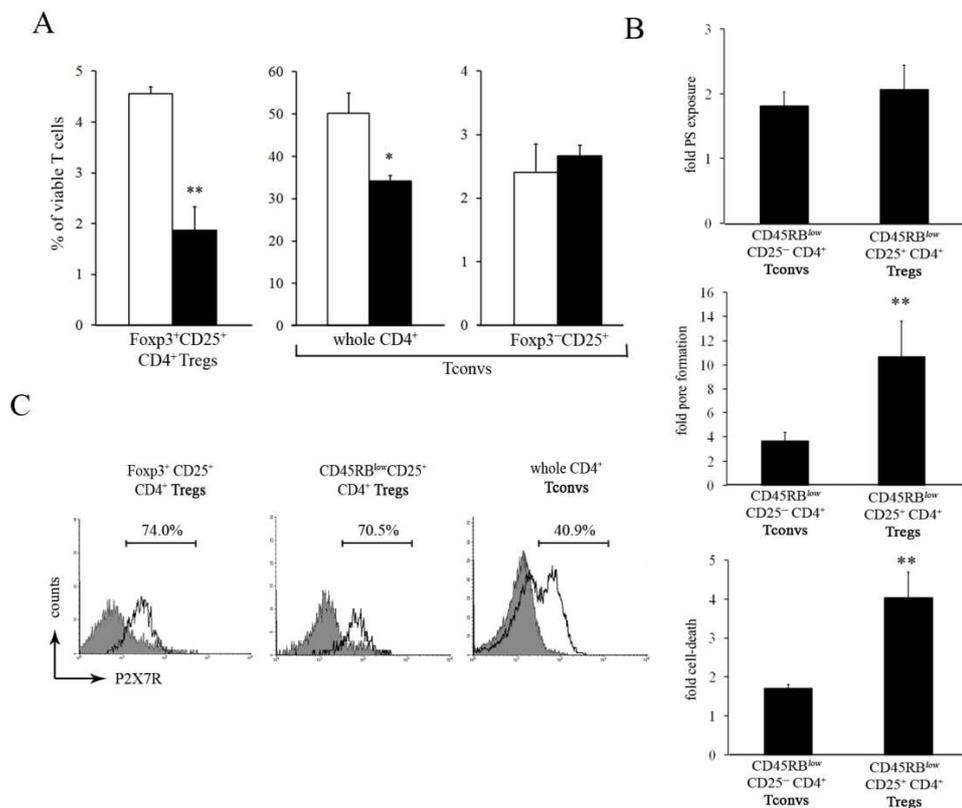
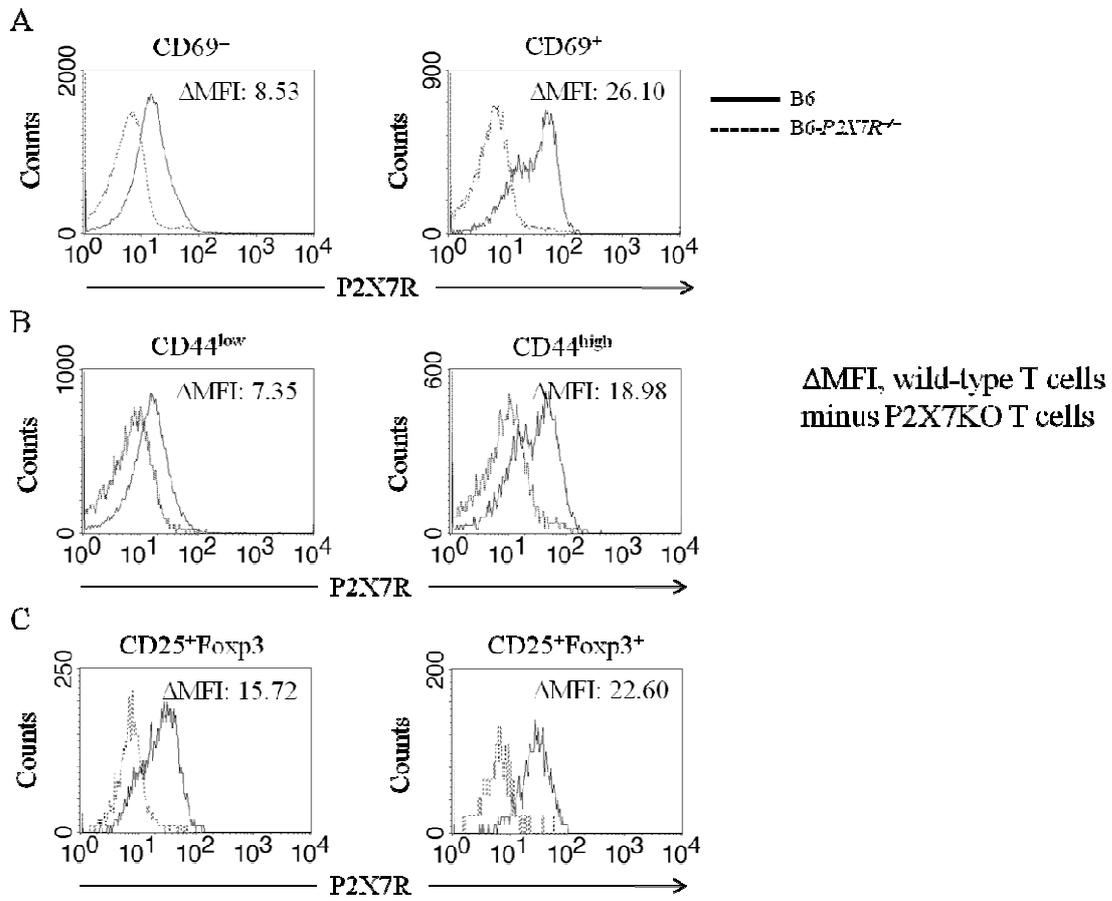


Figure 8. P2X7R expression on Tregs and Tconv subsets



Supplementary Figures

Figure 1

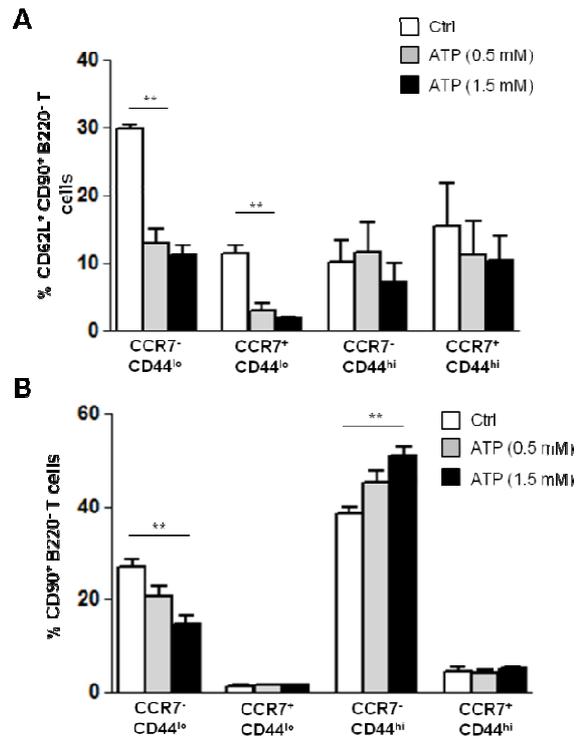
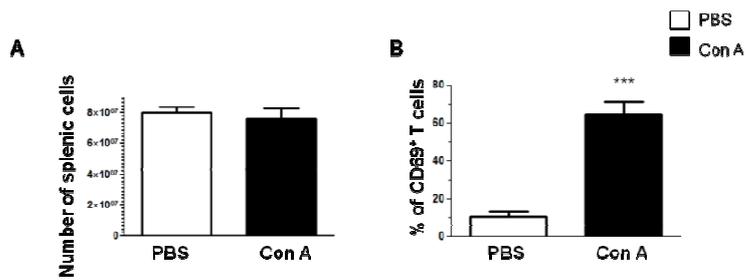


Figure 2



Supplementary Tables

* p < 0,05
 ** p < 0,01
 *** p < 0,001

Table 1 Percentage of splenic cells sub-populations in mice injected with either PBS or Con A

	CD80 ⁺ B220 ⁻	CD80 ⁺ B220 ⁺	CD80 ⁻ B220 ⁺	CD80 ⁻ B220 ⁻
PBS n=5	22.11 ± 3.06	4.76 ± 1.88	41.12 ± 6.79	32.01 ± 7.95
Con A n=13	24.35 ± 2.42	2.68 ± 0.33	50.17 ± 4.14	22.81 ± 4.18

Table 2 Percentage of CD80⁺ B220⁻ T-cell subsets according to their expression of early activation and late activation markers CD69 and CD44 respectively in mice injected with either PBS or Con A

	CD69 ⁻ CD44 ^{low}	CD69 ⁺ CD44 ^{low}	CD69 ⁻ CD44 ^{high}	CD69 ⁺ CD44 ^{high}
PBS n=7	57.03 ± 3.29	9.19 ± 2.54	26.90 ± 1.18	6.87 ± 1.34
Con A n=5	46.07 ± 4.13	30.69 ± 3.51 ***	13.10 ± 3.71**	10.15 ± 1.93

Table3 Percentage of CD62L⁺ T cell In mice Injected either with PBS or Con A

	CD69 ⁻	CD69 ⁺
PBS (n=3)	38.12 ± 0.96	61.88 ± 0.96 ***
Con A (n=5)	28.61 ± 6.79	59.86 ± 2.93 **

2. Matériels et méthodes supplémentaires

A. Formation du pore

Les cellules spléniques de souris B6 sauvages ou déficientes pour le récepteur P2X7 ont été pré-incubées avec 0 ou 100 μM de carbénoxolone (CBX) pendant 15 mn avant la stimulation par 0 ou 0,5 mM d'ATP pendant 30 mn à 37°C en présence de 5% de CO_2 . La molécule fluorescente YOPRO-1, dont l'incorporation permet de révéler la formation du pore, a été ajoutée à la concentration finale de 1 μM au moment de la stimulation par l'ATP. Après lavage, les récepteurs pour la partie Fc des anticorps des cellules spléniques ont été bloqués en les incubant quelques minutes avec des anticorps anti-CD16/CD32. Elles ont été ensuite incubées durant 30 mn à 4°C avec 0,1 μg d'anticorps anti-CD90, anti-B220 et anti-CD44, ou leurs isotypes contrôles, couplés aux fluorochromes ef450, APCef780 et Pcy5. Les cellules ont ensuite été lavées par un tampon phosphate (PBS) pour éliminer l'excès d'anticorps. Les cellules ont été reprises dans 400 μl de PBS et 1 $\mu\text{g/ml}$ d'iodure de propidium (IP) a été ajouté 5 mn avant l'analyse en cytométrie en flux. Les analyses ont été faites dans les populations de lymphocytes T $\text{CD90}^+ \text{B220}^-$ et 20 000 événements ont été acquis par échantillon.

B. Etude du clivage de la molécule CD62L par l'ATP dans les lymphocytes T en fonction de l'expression du marqueur CCR7

Les cellules spléniques de souris B6 sauvages ou déficientes pour le récepteur P2X7 ont été pré-incubées avec 0 ou 10 μM d'inhibiteur KN-62 pendant 15 mn avant la stimulation par 0 ou 0,5 mM d'ATP pendant 30 mn à 37°C en présence de 5% de CO_2 . Après lavage, les cellules ont été fixées avec un tampon contenant du para formaldéhyde (ebiosciences) pendant 15 mn à 4°C. Après lavage, les récepteurs pour la partie Fc des anticorps des cellules spléniques ont été bloqués en les incubant quelques minutes avec des anticorps anti-CD16/CD32. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 mn à 37°C avec 0,5 μg d'anticorps fluorescents anti-CCR7 (clone 4B12, ebiosciences) ou son isotype contrôle. Après lavage, les cellules ont été marquées par 0,1 μg d'anticorps anti-CD90, anti-B220 et anti-CD44, ou leurs isotypes contrôles, couplés aux fluorochromes ef450, APCef780 et Pcy5. Après lavage par du PBS, les cellules ont été reprises dans 400 μl de PBS pour l'analyse en cytométrie en flux. Les analyses ont été faites dans les populations de lymphocytes T $\text{CD90}^+ \text{B220}^-$ et 20 000 événements ont été acquis par échantillon.

C. Etude de l'activation de la caspase-9 dans les sous-populations de lymphocytes T

Les cellules spléniques issues de souris B6 sauvages ou déficientes pour le récepteur P2X7 ont été pré-incubées en présence de 0 ou 2 μM de l'inhibiteur de caspase à large spectre Q-VD-OPh pendant 15 mn avant la stimulation par 0 ou 0,5 mM d'ATP pendant 30 mn ou par 1 μM de staurosporine, comme contrôle positif d'activation de la caspase 9, pendant 3h à 37°C en présence de 5 % de CO_2 . Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec le réactif FLICA (ou *Fluorochrome Inhibitors of caspases*, CaspaTag Caspase-9 In Situ Assay Kit, Fluorescein, Chemicon) pendant 1h à 37°C en présence de 5

RESULTATS

% de CO₂. La base du kit est un substrat qui, une fois pénétré dans la cellule, subit un clivage par la caspase-9 activée. Ce clivage a lieu au niveau d'une séquence composée de 4 ou 5 acides aminés contenant obligatoirement un acide aspartique du côté C-terminal. Le FLICA est couplé à un fluorochrome qui devient fluorescent après le clivage et est donc détectable par cytométrie en flux. Après lavage de l'excès de FLICA par le tampon de lavage fourni dans le kit, les cellules sont fixées pendant 15 mn à température ambiante et dans l'obscurité. Après lavage, les récepteurs pour la partie Fc des anticorps des cellules spléniques ont été bloqués par des anticorps anti-CD16/CD32. Les cellules ont ensuite été incubées durant 30 mn à 4°C avec 0,1 µg d'anticorps anti-CD90, anti-B220, anti-CD69 et anti-CD44, ou leurs isotypes contrôles, couplés aux fluorochromes ef450, APCef780, Pe, et Pcy5. Après lavage, les cellules ont été reprises dans 400 µl de PBS pour l'analyse en cytométrie en flux. Les analyses ont été faites dans les populations de lymphocytes T CD90⁺ B220⁻ et 20 000 événements ont été acquis par échantillon.

D. Etude de la cinétique de l'influx calcique dépendant du récepteur P2X7

Les cellules spléniques de souris B6 sauvages ont été chargées par 4 µM de Fluo-4 AM pendant 50 mn à température de la pièce et sous agitation. Après lavage, les récepteurs pour la partie Fc des anticorps des cellules spléniques ont été bloqués par des anticorps anti-CD16/CD32. Les cellules ont ensuite été incubées avec 0,1 µg d'anticorps anti-CD90, anti-B220, anti-CD69 et anti-CD44, ou leurs isotypes contrôles, couplés aux fluorochromes ef450, APCef780, Pe et Pcy5. Après lavage par du PBS, les cellules ont été reprises dans 1 ml de RPMI contenant 0,4 mM de calcium pour l'analyse en cytométrie en flux. L'intensité de fluorescence moyenne (*Mean of Fluorescence Intensity* ou MFI) du Fluo-4 a été mesurée dans les cellules en absence ou en présence de 0,5 mM d'ATP. Le rapport entre la MFI obtenue en présence d'ATP et celle obtenue en absence d'ATP a ensuite été calculé. La fluorescence dans les lymphocytes T CD90⁺ B220⁻ a été mesurée durant 300 secondes.

3. Résultats complémentaires à l'article 1

A. L'incorporation du YO-PRO-1 est indépendante de la mort cellulaire

La molécule YO-PRO-1, une sonde fluorescente non perméante, se fixe sur l'ADN après perméabilisation de la membrane plasmique des cellules. Elle peut ainsi être utilisée comme marqueur de formation du pore induit par la stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP mais aussi comme marqueur de mort cellulaire. Pour cela, nous avons vérifié que la formation de pore, visualisée par l'incorporation du YO-PRO-1, dans les sous-populations de lymphocytes T est indépendante de la mort cellulaire en utilisant simultanément le YO-PRO-1 et l'IP. Comme mentionné précédemment, le pore dépendant du récepteur P2X7 des lymphocytes est perméable aux molécules ayant une taille inférieure à 400 Da. L'IP, dont la taille est de 668 Da, ne sera incorporé que dans les lymphocytes mourants. L'histogramme de la Figure 17 montrent que le pourcentage des lymphocytes T CD90⁺ B220⁺ YO-PRO-1⁺ augmente de 21% après stimulation par 0,5 mM d'ATP

RESULTATS

et de 25% après stimulation par 1,5 mM d'ATP. Cet effet est bien dépendant du récepteur P2X7 puisque le prétraitement des lymphocytes T par 10 μ M de l'antagoniste KN-62 inhibe l'incorporation du YO-PRO-1. L'incorporation de la sonde YO-PRO-1 après stimulation par l'ATP ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux d'incorporation de l'IP dans les lymphocytes (~ 5% de lymphocytes T CD90⁺ B220⁺ IP⁺) confirmant que le marquage par le YO-PRO-1 est bien dû à la formation du pore et non pas à une mort cellulaire (cf. **Figure 17**)

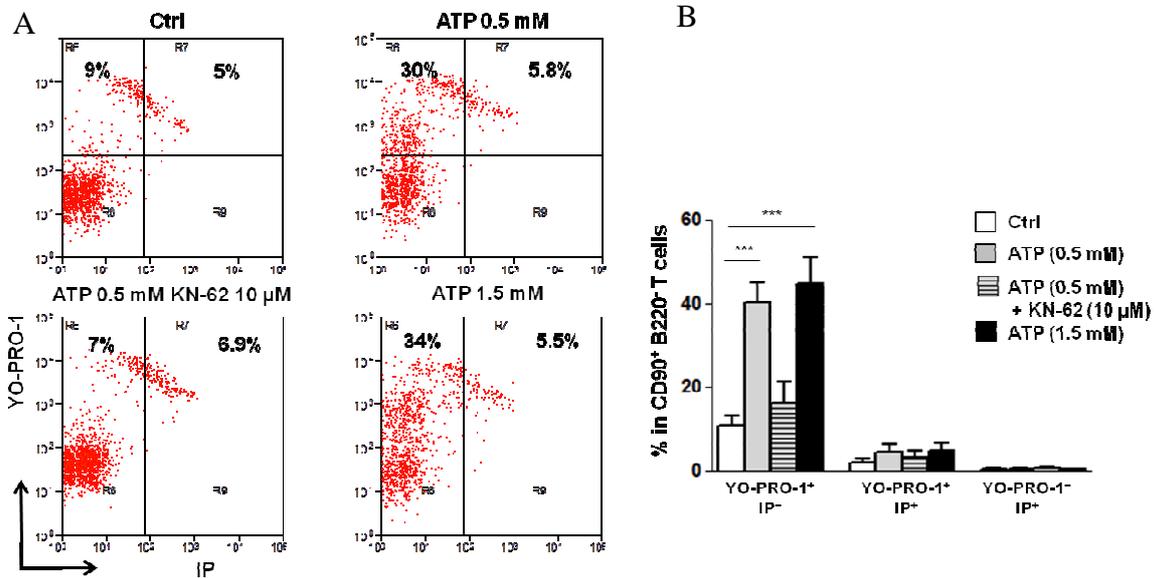


Figure 17 : Le pore dépendant du récepteur P2X7 se forme indépendamment de la mort cellulaire.

A. Dot Plots représentatifs de 3 expériences indépendantes montrant l'incorporation de la sonde YO-PRO-1 et de l'IP par les lymphocytes T prétraités pendant 15 mn avec 0 ou 10 μ M de l'antagoniste KN-62 puis stimulés par 0, 0,5 ou 1,5 mM d'ATP pendant 30 mn à 37°C en présence de 5% de CO₂. **B.** Histogrammes présentant la moyenne du pourcentage des lymphocytes T CD90⁺ B220⁻ YO-PRO⁺ IP⁻, YO-PRO⁺ IP⁺ et YO-PRO⁻ IP⁺ dans les mêmes conditions de traitement que dans la partie A de la figure. 20 000 événements ont été acquis par conditions. L'expérience a été répétée trois fois avec n=3 souris par expérience. ***<0.001.

B. La formation du pore est indépendante de la pannexine-1

L'implication de la pannexine-1 dans la formation du pore a été largement discutée précédemment. Nous avons vérifié, par l'utilisation d'un inhibiteur de la pannexine-1, si cette protéine est impliquée dans la formation du pore dans les lymphocytes T de souris B6. La **Figure 18 A** montre que le pourcentage de YO-PRO-1 incorporé augmente de 33 % dans les lymphocytes T CD44^{low} et de 43% dans les lymphocytes T CD44^{high} après stimulation par 0,5 mM d'ATP. Cette formation de pore est absente dans les lymphocytes T issus de souris P2X7 KO montrant que cette formation de pore est bien dépendante du récepteur P2X7 (cf. **Figure 18 B**). Ces résultats confirment encore une fois que la sous-population de lymphocytes T CD44^{high} est significativement ($p < 0,05$) plus sensible à la formation du pore dépendant du récepteur P2X7 que la sous-population CD44^{low}. L'utilisation de 100 μ M de CBX, un inhibiteur de la pannexine-1, n'a pas d'effet sur la formation de pore suggérant que la pannexine-1 n'est pas impliquée dans la formation du pore des lymphocytes T spléniques.

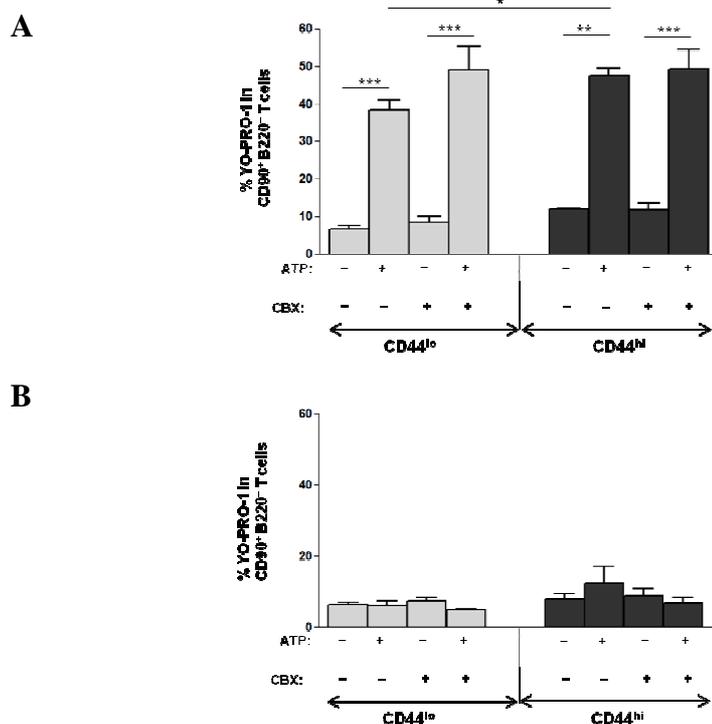


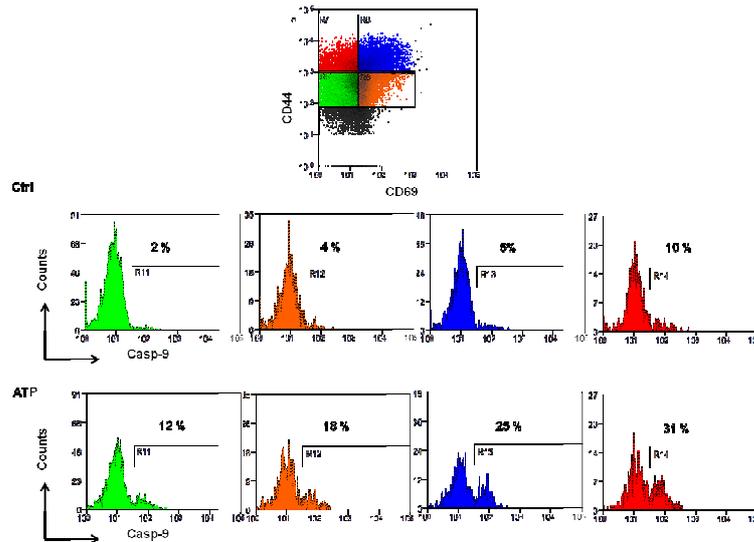
Figure 18 : La formation du pore P2X7 est indépendante de la pannexine-1.

A. Histogramme montrant la moyenne du pourcentage de cellules YO-PRO-1⁺ dans les lymphocytes T spléniques CD90⁺ B220⁻ de souris B6 sauvages de phénotype CD90⁺ B220⁻ CD44^{low} ou CD44^{high} et prétraités par 100 μM de CBX pendant 15 mn puis stimulés par 0,5 mM d'ATP pendant 30 mn à 37°C en présence de 5% de CO₂. **B.** Histogramme montrant le pourcentage de cellules YO-PRO-1⁺ dans les sous-populations de lymphocytes T spléniques, de souris B6 P2X7 KO, de phénotype CD90⁺ B220⁻ CD44^{low} ou CD44^{high} dans les mêmes conditions de traitement que dans la partie A de la figure. 20 000 événements ont été acquis par condition. L'expérience a été répétée au moins trois fois avec n = 3 souris par expérience. *<0.05, **<0.01, ***<0.001. lo : low ; hi : high

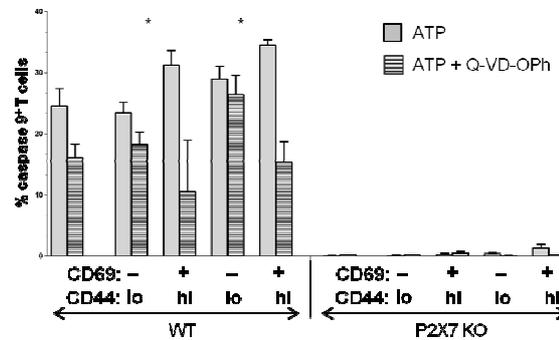
C. Les lymphocytes T récemment activés sont les sous-populations les plus sensibles à l'apoptose

Comme décrit précédemment, l'externalisation de la PS peut également être liée à l'apoptose. Nous avons donc vérifié si l'externalisation de la PS que nous observons dans les sous-populations de lymphocytes T s'accompagne d'une activation des caspases-9. La Figure 19 A montre que la caspase-9 est bien activée suite à une stimulation par 0,5 mM d'ATP et cela dans toutes les sous-populations de lymphocytes T de souris B6 sauvages, mais pas de souris B6 P2X7 KO, indiquant que l'activation de la caspase-9 est dépendante du récepteur P2X7. Le taux d'activation de la caspase-9 présente cependant des différences selon le stade d'activation : les lymphocytes T récemment activés (CD44^{low} CD69⁻ et CD44^{high} CD69⁺) étant les populations les plus sensibles. Cette activation de la caspase-9 a été partiellement inhibée par l'inhibiteur pan-caspase Q-VD-Oph. Ce profil de sensibilité rappelle celui de l'externalisation de la PS (**Figure 4 de l'Article 1**) qui est fortement induit dans les lymphocytes T récemment activés (CD44^{low} CD69⁻ et CD44^{high} CD69⁺) suggérant que l'externalisation de la PS observée dans ces sous-populations est fort probablement liée à une activation de la caspase-9 (*cf.* **Figure 19**).

A



B



C

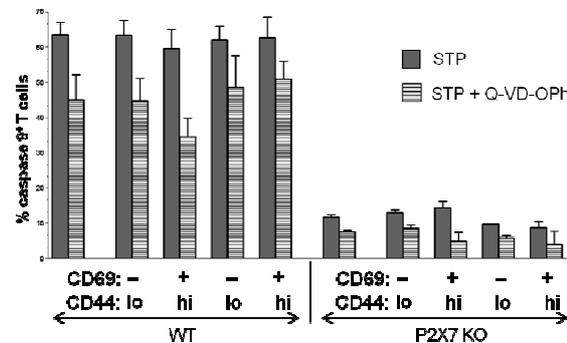


Figure 19 : Activation de la caspase-9 dépendante du récepteur P2X7 dans les sous-populations de lymphocytes T.
A. Dots-plots représentatif de 3 expériences indépendantes montrant le pourcentage de caspases-9 activées induites en absence (Ctrl) ou en présence de 0,5 mM d'ATP dans les lymphocytes T spléniques CD90⁺ B220⁻, de souris B6 sauvage, à différents stades d'activation : CD69⁻ CD44^{lo} en vert, CD69⁺ CD44^{lo} en orange, CD69⁻ CD44^{hi} en bleu et CD69⁺ CD44^{hi} en rouge. Les chiffres dans les dots plots correspondent aux pourcentages de caspases-9 activées. **B.** Histogramme montrant la moyenne du pourcentage de caspases-9 activées après stimulation par l'ATP dans les sous-populations de lymphocytes T spléniques de souris B6 sauvages ou B6 P2X7 KO normalisée par rapport au contrôle. Dans certaines conditions les cellules spléniques ont été prétraitées durant 15 mn par 10 μM de l'inhibiteur de caspase Q-VD-Oph avant la stimulation par 0,5 mM d'ATP. **C.** Histogramme montrant la moyenne du pourcentage de caspases-9 activées après stimulation par 1 μM de staurosporine dans les sous-populations de lymphocytes T spléniques issus de souris B6 sauvage ou B6 P2X7 KO normalisé par rapport au contrôle. Dans certaines conditions les cellules spléniques ont été prétraitées durant 15 mn par 10 μM de l'inhibiteur de caspase Q-VD-Oph avant la stimulation par 1 μM de staurosporine (STP). Ces histogrammes sont représentatifs de trois expériences indépendantes avec n = 3 souris. 20 000 événements ont été acquis par condition. Les deux premiers histogrammes présentent l'analyse réalisée dans la population totale de lymphocytes T CD90⁺ B220⁻. (**Figures 19 B et C**) Lo : low. Hi : high. * < 0.05.

D. Sensibilité à l'influx calcique des sous-populations de lymphocytes T

La Figure 6 de l'Article 1 montre que la formation du pore dans les lymphocytes T est dépendante de la signalisation calcique. Cela nous a amené à poser la question de l'origine intra ou extracellulaire du calcium impliqué. Nous avons postulé que l'influx calcique induit par l'activation du récepteur P2X7 est à l'origine de la formation du pore. Pour cela, nous avons étudié, en cytométrie en flux, la cinétique de l'influx calcique dans les sous-populations de lymphocytes T en réponse à l'ATP. La Figure 20 montre que l'index de stimulation du calcium augmente au cours des 100 premières secondes suivant la stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP et ensuite se stabilise. Cependant, les courbes de cinétiques montrent qu'il n'y a pas de différence significative de sensibilité à différents stades d'activation du moins au cours des 300 secondes étudiées. Nous ne pouvons donc pas exclure l'existence d'une différence de sensibilité dans les premières millisecondes suivant l'ajout de l'ATP qui ne seraient pas détectables par la technique de cytométrie de flux d'où la nécessité de tester l'influx calcique par d'autres techniques comme la spectrophotométrie ou le patch clamp. (cf. Figure 20).

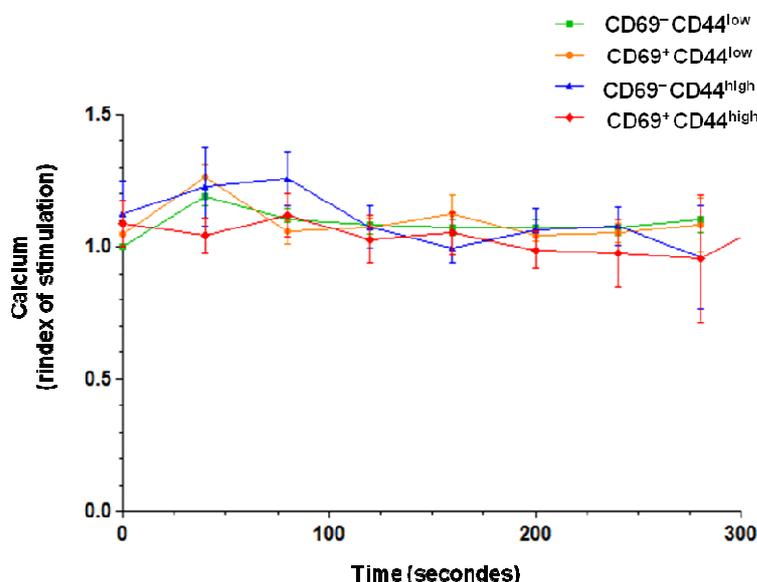


Figure 20 : Cinétique de l'influx calcique dans les lymphocytes T à différents stades d'activation en réponse à l'ATP.

Les cellules spléniques de souris B6 sauvages ont été chargées avec 4 μ M de sonde Fluo-4 AM en présence de 0,4 mM de calcium pendant 50 mn à température ambiante et sous agitation. Les cellules ont été ensuite lavées et marquées par les anticorps fluorescents dirigés contre les molécules CD90, B220, CD69 et CD44 pendant 30 mn à 4°C. L'excès d'anticorps a ensuite été lavé et les cellules ont été reprises dans un milieu RPMI 1640 contenant 0,4 mM de nitrate de dicalcium. La cinétique a été étudiée en cytométrie de flux et l'index de stimulation calcique a été calculé par le rapport de la MFI du Fluo-4 après stimulation par 0,5 mM d'ATP sur la MFI basal du Fluo-4 AM. L'analyse a été faite dans la population de lymphocytes T CD90⁺ B220⁻; n = 4 souris.

E. Expression des marqueurs d'activation sur des lignées de lymphocytes T

Différentes lignées tumorales murines de lymphocytes T ont été analysées pour l'expression des différents marqueurs d'activation. La lignée EL4 est un lymphoblaste T issu d'un lymphome de souris B6 alors que la lignée BW5147 est un thymome issu du thymus d'une souris AKR. La Figure 21 montre que les lignées EL4 et BW5147 expriment les marqueurs d'activation CD44 et CD45RB mais pas le marqueur CD69.

RESULTATS

Alors que la lignée BW5147 exprime de forts taux de CD44, la lignée EL4 exprime des taux faibles. L'expression du marqueur d'activation tardif CD44 sur ces lignées est cohérente avec l'expression du marqueur CD45RB puisque la lignée EL4 qui est de phénotype CD44^{low} exprime des taux élevés de CD45RB (CD45RB^{high}) alors que la lignée BW5147 qui est de phénotype CD44^{high} exprime de faible taux de CD45RB (CD45RB^{low}). Ces deux lignées sont négatives pour l'expression de CD45RABC ou B220. Nous ne pouvons pas exclure l'expression d'autres isoformes de la molécule CD45 contenant l'exon B qui sont reconnus par l'anticorps anti-CD45RB.

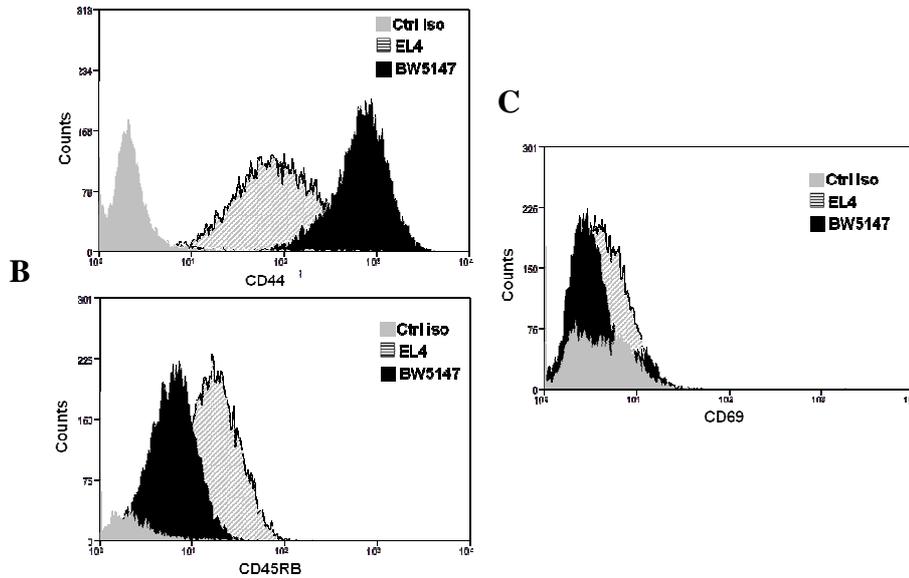


Figure 21 : Expression des marqueurs d'activation CD44, CD45RB et CD69 sur les lignées tumorales de lymphocytes T EL4 et BW5147

Un million de cellules murines EL4 et BW5147 ont été incubées avec 0,1 µg d'anticorps anti-CD90, anti-CD44 et anti-CD45RB pendant 30 mn à sur glace. **A.** Histogramme montrant l'expression de CD44 à la membrane des lignées EL4 (gris avec des rayures) et BW5147 (en noir) par rapport au contrôle isotypique (en gris). **B.** Histogramme montrant l'expression de CD45RB à la membrane des lignées EL4 (gris avec des rayures) et BW5147 (en noir) par rapport au contrôle isotypique. **C** Histogramme montrant l'expression de CD69 à la membrane des lignées EL4 (gris avec des rayures) et BW5147 (en noir) par rapport au contrôle isotypique

Discussion et perspectives

Dans ce travail de thèse, j'ai étudié plusieurs des activités induites par la stimulation du récepteur P2X7 notamment le clivage de la molécule de homing CD62L ou L-sélectine, l'ouverture du canal ionique, la formation du pore et l'externalisation de la PS dans les lymphocytes T à différents stades d'activation. Mes principaux résultats montrent que l'activation du récepteur P2X7 par l'ATP n'induit pas automatiquement l'ensemble de ces activités à l'inverse de ce qui est souvent affirmé dans de nombreuses études où les auteurs tirent, à partir de l'étude d'une ou deux activités, des conclusions pour l'ensemble des activités que le récepteur P2X7 peut potentiellement induire. Cette dissociation des activités du récepteur P2X7 est particulièrement évidente lorsque l'on analyse la sensibilité à l'ATP des lymphocytes T en fonction de leurs stades d'activation. Par exemple, j'ai observé que les lymphocytes T au stade effecteur/mémoire sont moins sensibles au clivage de la molécule CD62L que les sous-populations de lymphocytes T au stade naïf et récemment activé (CD69⁺). J'ai montré que la sous-population de lymphocytes T au stade récemment activé en réponse immunitaire primaire est la sous-population la plus sensible à la formation du pore. De plus, les sous-populations de lymphocytes T récemment activés (CD69⁺), aussi bien en réponse immunitaire primaire (CD44^{low}) que secondaire (CD44^{high}), sont les plus sensibles à l'externalisation de la PS. Enfin, dans la sous-population de lymphocytes T récemment activé CD69⁺ CD44^{low}, les activités de formation du pore et d'externalisation de la PS, mais pas de clivage des molécules de homing CD62L, sont dépendantes du taux de calcium. D'autre part, nous avons montré que, contrairement à ce qui a été rapporté, les anticorps dirigés contre l'exon B de l'isoforme CD45RB reconnaissent les autres isoformes exprimant l'exon B notamment l'isoforme B220. De plus, les lymphocytes Trég CD45RB^{high} ou Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺ sont plus sensibles que les lymphocytes T conventionnels activés CD45RB^{high}CD25⁺CD4⁺ et naïfs CD45RB^{high}CD25⁻CD4⁺ à l'activation du récepteur P2X7 et cela n'est pas lié à une plus forte expression du récepteur P2X7.

A. Dissociation des activités dépendantes du récepteur P2X7 selon le stade d'activation des lymphocytes T

Le rapport de Chused et coll. de 1996, comparant la sensibilité des différentes sous-populations de lymphocytes T, montre que les lymphocytes T présentent une différence de sensibilité aux activités induites par le récepteur P2X7 selon le stade d'activation avec les lymphocytes T naïfs CD45RB^{high} CD44^{low} qui sont moins sensibles que les lymphocytes T effecteurs/mémoires CD45RB^{low} CD44^{high} [357]. Le travail d'Elliot et coll a décrit une association des différentes activités dépendantes du récepteur P2X7. Ainsi, ils ont rapporté que les activités d'externalisation de la PS, de clivage de CD62L et d'influx calcique sont associées et par conséquent sont exécutées dès que le récepteur P2X7 est activé dans les lymphocytes T murins (« *All or none phenomenon* »)[285]. Cependant, le travail récent de Foster et coll a montré que l'activité de clivage de CD62L et l'activité d'externalisation de la PS sont dissociées dans la sous-population de lymphocyte T humain CD4⁺ au stade naïf. Ainsi, l'externalisation de la PS en réponse à l'ATP a lieu uniquement après inhibition de la production des ROS par des inhibiteurs pharmacologique des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale [299]. Ce travail est le premier à

notre connaissance décrivant une dissociation des activités du récepteur P2X7 dans la même sous-population. Cependant, les auteurs ont utilisé des billes magnétiques couplées à des anticorps (technologie MACS) pour purifier les lymphocytes T CD4⁺ au stade naïf sans utilisation de marqueurs d'activation pour exclure les lymphocytes T CD4⁺ au stade effecteur/mémoire. De plus, ils ne comparent pas la sensibilité au clivage de CD62L dans le stade naïf avec d'autres stades d'activation.

Notre travail présente une étude plus détaillée sur la modulation des activités du récepteur P2X7 aux différents stades d'activation des lymphocytes T. D'une part, nous avons étudié quatre activités cellulaires du récepteur P2X7 : l'ouverture du canal ionique, le clivage de CD62L, la formation du pore et l'externalisation de la PS. D'autre part, nous avons étudié ces activités cellulaires dans les différents stades d'activation des lymphocytes T en se basant sur l'expression de deux marqueurs d'activation, un marqueur précoce, le CD69 et un marqueur tardif, le CD44. Nos résultats montrent qu'il existe effectivement une différence de sensibilité à l'activation entre les sous-populations de lymphocytes T selon le stade d'activation. Cependant, ce phénomène est plus compliqué que ce qui a été proposé dans les publications antérieures : la sensibilité à l'activation du récepteur P2X7 est non seulement dépendante du stade d'activation mais aussi de l'activité étudiée. La résistance des sous-populations de lymphocytes T au stade effecteur/mémoire (CD69⁻ CD44^{high} et CD69⁺ CD44^{high}) au clivage de CD62L mais pas à la formation du pore ou à l'externalisation de la PS après stimulation du récepteur P2X7 indique que l'activité clivage de CD62L est dissociée des activités d'externalisation de la PS et de la formation de pore du moins dans les lymphocytes T effecteurs/mémoires (*cf. Tableau 7*).

Pour la suite de ce travail, il semble intéressant d'étudier les voies de signalisation impliquées dans cette modulation des activités cellulaires dépendantes du récepteur P2X7 dans les sous-populations de lymphocytes T. Si l'on se base sur les résultats de Foster et coll [299], il serait prometteur d'étudier dans la sous-population de lymphocytes T récemment activés (CD69⁺ CD44^{low} et CD69⁺ CD44^{high}), qui présente une grande sensibilité à l'externalisation de la PS après traitement par l'ATP, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que l'implication des complexes mitochondriaux et de la NADPH oxydase dans l'externalisation de la PS. Cette étude pourrait être réalisée en cytométrie en flux en utilisant des sondes fluorescentes spécifiques des différents types de ROS (anion superoxyde, radical hydroxyle, H₂O₂) ou de la molécule antioxydante, GSH, afin de quantifier leur taux dans les lymphocytes T activés après stimulation par l'ATP. Il serait également possible de bloquer la production de ROS à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques afin d'évaluer l'impact des ROS sur l'externalisation des PS induite par l'ATP.

Concernant la formation du pore dépendante du récepteur P2X7, il nous semble important de vérifier si les lymphocytes T forment le pore anionique en réponse à l'ATP en utilisant la sonde anionique Lucifer Yellow [267]. Il est important de vérifier si les autres récepteurs purinergiques aussi présents sur les lymphocytes T, P2X4 et P2X2, participent à la formation du pore observée. Pour cela, nous pouvons étudier la formation du pore dépendante de l'ATP dans des lymphocytes T à différents stades d'activation en utilisant des souris génétiquement déficientes pour P2X4 ou bien des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des récepteurs P2X2 et P2X4

Tableau 7: Tableau résumant la modulation des activités du récepteur P2X7 dans les sous-populations de lymphocytes T en fonction de leur stade d'activation

Activités de P2X7R	Réponse immunitaire primaire		Réponse immunitaire secondaire	
	Naïf CD69 ⁻ CD44 ^{low}	Récemment activé CD69 ⁺ CD44 ^{low}	Effecteur/mémoire CD69 ⁻ CD44 ^{high}	Effecteur/mémoire activé CD69 ⁺ CD44 ^{high}
Clivage de CD62L	+++	+++	+/-	+/-
Formation du pore	++	+++	++	++
Externalisation de la PS	+	+++	+	+++

+/- : faible, + : modéré, ++ : forte, +++ : très forte

B. Spécificité des anticorps dirigés contre les isoformes de CD45

Notre travail précédent (Article 2 voir ANNEXE) suggère que l'isoforme B220 de la phosphatase de membrane CD45 joue un rôle de régulateur négatif de l'expression membranaire du récepteur P2X7 et par conséquent de son activation par l'ATP. Cependant, les résultats contradictoires de Taylor [283] et d'Aswad [282], en particulier concernant le rôle de l'isoforme CD45RB dans la régulation négative des activités du récepteur P2X7, nous ont amené à préciser la spécificité des anticorps dirigés contre les isoformes de la famille CD45. En effet, nous considérons que les anticorps anti-CD45RB utilisés dans ces études, pour démontrer que la forte expression de CD45RB (CD45RB^{high}) à la surface des lymphocytes T est associée à une perte des activités du récepteur P2X7 induite par l'ATP, ont conduit les auteurs à des conclusions erronées. Nous pensons que les auteurs ont observé une perte des activités du récepteur P2X7 non pas dans les lymphocytes T CD45RB^{high} mais dans les lymphocytes T B220⁺ car l'anticorps utilisé n'est pas spécifique de CD45RB, malgré ce qu'ils affirment dans leur articles, mais du produit de l'exon B. Afin de valider notre hypothèse, nous avons transfecté des cellules de la lignée COS-7 avec un vecteur d'expression codant pour l'isoforme B220 (ou CD45RABC) et démontré en cytométrie en flux que l'anticorps commercial anti-CD45RB reconnaît parfaitement bien l'isoforme CD45RABC comme d'ailleurs les anticorps commerciaux anti-CD45RA ou anti-CD45RC puisqu'ils sont dirigés contre, respectivement, le produit de l'exon A, l'exon B ou l'exon C. Le seul anticorps qui soit spécifique d'une isoforme est l'anticorps anti-B220 puisqu'il reconnaît un épitope formé de l'association des trois exons A, B et C et des sucres associés. D'ailleurs, nos études sur la sensibilité à l'ATP des lymphocytes T naïfs (CD45RB^{high}) ou effecteurs/mémoires (CD45RB^{low}), desquels ont été exclus les lymphocytes T pré-apoptotiques B220⁺, montrent que la sous-population CD45RB^{high} est capable, tout aussi efficacement que la sous-population CD45RB^{low}, de cliver CD62L, de former le pore et d'externaliser la PS en réponse à l'ATP. Ces résultats suggèrent que la sous-population décrite par le groupe de Taylor est probablement contaminée par la sous-population B220⁺ résistante à l'ATP et reconnue par l'anticorps anti-CD45RB. C'est la raison pour laquelle nous avons toujours tenu à exclure la sous-population de lymphocytes T CD90⁺ B220⁺, déficiente pour l'activation du récepteur P2X7, dans nos analyses de cytométrie en flux.

C. Etude de la sensibilité des Trég à l'activation du récepteur P2X7

Nos résultats sur la spécificité des anticorps dirigés contre l'isoforme CD45RB nous ont amené à remettre en cause les conclusions de Taylor et coll [283] concernant la sensibilité à l'ATP des lymphocytes Trég Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺, des lymphocytes T conventionnels activés CD45RB^{low} CD25⁺ CD4⁺ et naïfs CD45RB^{high} CD25⁻ CD4⁺. Alors qu'Aswad et coll [282] ont décrit que les lymphocytes Trég Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ ont une plus grande sensibilité à l'externalisation de la PS et à la mort cellulaire induite par l'ATP que les lymphocytes T conventionnels CD25⁻CD4⁺, le groupe de Taylor et coll [283] a rapporté que ces deux sous-populations présentent la même sensibilité à l'ATP à condition qu'ils expriment de faibles taux en CD45RB [283]. Nos résultats ont confirmé ceux d'Aswad et coll, à savoir, une sensibilité plus grande à la mort cellulaire induite par l'ATP des lymphocytes Trég Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ que les lymphocytes T conventionnels CD45RB^{low} CD25⁻ CD4⁺. De plus, la forte sensibilité à l'ATP, dans les lymphocytes Trég, semble être liée à l'expression membranaire du récepteur P2X7. Il serait intéressant de voir l'impact de la grande sensibilité des lymphocytes Trég à la mort induite par le récepteur P2X7 sur la gravité des maladies inflammatoires, par exemple dans le modèle de souris atteinte de colite induite par le TNBS, sauvages ou déficientes pour le récepteur P2X7, où une grande quantité d'ATP est secrétée.

D. Faible sensibilité des lymphocytes T au stade effecteur/mémoire au clivage de CD62L dépendant du récepteur P2X7

Après activation par l'antigène et expansion clonale, les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ se différencient en lymphocytes effecteurs. Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Th1, Th2, Th17, Trég) présentent une grande hétérogénéité fonctionnelle se caractérisant par des profils de sécrétion en cytokines différents. Les lymphocytes T mémoires sont issus du petit nombre de lymphocytes T effecteurs qui ont échappé aux mécanismes d'apoptose responsables du maintien de l'homéostasie. Ces lymphocytes T mémoires doivent donc migrer vers les organes lymphoïdes pour pouvoir être activés par les antigènes présentés par les APC avant de retourner aux sites inflammatoires pour exécuter leurs fonctions effectrices. Nos résultats (Article 1) suggèrent que ces lymphocytes T effecteurs/mémoires sont résistants au clivage de CD62L en réponse à 0,5 mM d'ATP. Cependant, nous avons observé que les lymphocytes T effecteurs/mémoires traités par de très fortes doses d'ATP, de l'ordre de 1 mM, peuvent cliver CD62L bien que ce clivage reste moins efficace que celui exécuté par les lymphocytes T au stade naïf ou naïf activé (CD44^{low}CD69⁺). Plusieurs hypothèses se présentent pour expliquer cette faible sensibilité au clivage de CD62L :

1) Comme déjà mentionné dans l'introduction, le clivage de CD62L passe par les métalloprotéases ADAM-17 et ADAM-10 [294]. Nos résultats montrant que le clivage des molécules CD62L peut être induit dans toutes les sous-populations de lymphocytes T par un traitement à la PMA indique qu'ADAM 17 est parfaitement fonctionnelle. On peut donc imaginer qu'il y aurait un défaut d'ADAM-10 dans la sous-population des

lymphocytes T effecteurs/mémoires entraînant une faible efficacité du clivage en réponse à l'ATP. Pour tester cette hypothèse, la sensibilité au clivage de CD62L sera testée dans les lymphocytes T, aux différents stades d'activation, en présence de la PMA seule ou en combinaison avec de l'ionomycine qui est un activateur d'ADAM-10.

2) On peut imaginer l'existence d'un mécanisme indépendant des métalloprotéases mais qui impliquerait les ERM comme dans le cas du clivage de l'APP dépendant du récepteur P2X7 [298]. Pour vérifier cette hypothèse, il est nécessaire d'évaluer, par microscopie confocale, s'il y a une colocalisation des molécules CD62L, des ERM et du récepteur P2X7 dans les sous-populations de lymphocytes T de souris. Dans le cas échéant, on étudiera la phosphorylation des ERM après stimulation par l'ATP. De plus, le clivage des molécules CD62L dépendant des ERM peut aussi être étudié en utilisant des siRNA bloquants les ERM, dans des lignées lymphocytaires T (EL-4, BW5147) transfectées par les molécules CD62L et/ou le récepteur P2X7.

3) La calmoduline ayant été décrite comme étant un régulateur négatif du clivage des molécules CD62L [296,297], il nous semble intéressant de quantifier son taux et d'étudier son activation dans les lymphocytes T effecteur/mémoires.

Enfin, il nous semble intéressant d'étudier les fonctions effectrices des lymphocytes T, en réponse à des stimulations antigéniques ou à des mitogènes, en termes de production d'IL-2 et de cytokines inflammatoires ainsi que leur capacité à sécréter les perforines/granzymes dans le cas des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Ces études nous permettront de mieux comprendre l'impact physiologique de cette différence de sensibilité au clivage de CD62L en réponse à l'ATP dans des contextes physiologiques différents en particulier de type inflammatoires.

E. La formation du pore et l'externalisation de la PS par les lymphocytes T au stade naïf activé sont dépendant de la signalisation calcique

En se basant sur des rapports précédents étudiant l'association des activités pore [269] et d'externalisation de la PS [281] avec la signalisation calcique, j'ai étudié si le calcium est impliquée dans la modulation de la formation du pore et l'externalisation de la PS dans les lymphocytes T selon leur stade d'activation. Nos résultats montrent que la sous-population des lymphocytes T au stade naïf activé (CD69⁺ CD44^{low}), forment le pore en réponse à l'ATP d'une façon dépendante du calcium intracellulaire. D'autre part, l'externalisation de la PS dans la même sous-population de lymphocytes T au stade naïf activé est dépendante à la fois du calcium extracellulaire et intracellulaire. En revanche, le clivage de CD62L en réponse à l'ATP n'est dépendant ni du calcium intracellulaire ni du calcium extracellulaire. Cela indique une dissociation entre l'activité de clivage et les autres activités en particulier la formation du pore et l'externalisation de la PS induites par l'activation du récepteur P2X7. Le calcium intracellulaire impliqué dans la formation du pore et l'externalisation de la PS peut avoir plusieurs origines notamment le canal ionique formé par le récepteur P2X7 ou bien les autres récepteurs purinergiques entraînant un influx calcique du milieu extracellulaire ou encore la libération du calcium provenant du réticulum endoplasmique. Notre étude par cytométrie de flux sur la cinétique de l'influx

calcique induit par la stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP n'étant pas concluante, nous pensons que l'utilisation de techniques d'électrophysiologie ou bien de spectrophotométrie appliqués aux lymphocytes T purifiés par trieur de cellules (FACS) ou par billes magnétiques (technologie MACS) à différents stades d'activation est plus appropriée pour suivre à des temps plus précoces la cinétique de l'influx calcique en réponse à l'ATP. De plus, il nous semble intéressant d'approfondir cette étude de l'implication de la signalisation calcique dans les activités de formation de pore et d'externalisation de la PS en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des autres récepteurs purinergiques ou bien des activateurs de canaux calciques ou de la sécrétion du calcium.

F. Etude des activités cellulaires du récepteur P2X7 des lignées tumorales de lymphocytes T

Nos résultats sur les lignées murines de lymphocytes T, EL-4 et BW5147, montrent que ces lignées se trouvent à des stades d'activation différents : EL-4 est au stade naïf ($CD45^{RB^{high}} CD44^{low}$) et BW5147 est au stade activé ($CD45^{RB^{low}} CD44^{high}$). Il nous semble donc important d'étudier l'expression du récepteur P2X7 dans ces lignées, et le cas échéant, d'étudier la sensibilité de ces deux lignées à la formation du pore, l'externalisation de la PS ainsi que l'influx calcique induits par l'ATP.

G. Etude du mécanisme par lequel la molécule B220 régule négativement le récepteur P2X7

Nous avons montré que l'isoforme B220 de la phosphatase de membrane CD45 régule négativement l'expression membranaire du récepteur P2X7, et par conséquent son activation, dans les lymphocytes T en fin de réponse immunitaire [367]. Il a été décrit qu'une isoforme de la protéine du cytosquelette spectrine, la fodrine, est dégradée suite à une stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP dans la lignée de cellules épithéliales salivaires Par C5 [368]. Cette protéine est impliquée dans l'adressage des protéines membranaires du réticulum endoplasmique et leur ancrage à la membrane cellulaire. Ainsi, il a été décrit que la fodrine est impliquée dans l'adressage des molécules CD45 et CD3 à la membrane cellulaire suite à l'activation des lymphocytes T [369]. De plus, lors de la mort cellulaire induite par la galectine-1, un ligand potentiel de la molécule CD45, on observe une dégradation de la fodrine par les calpaïnes. Cette dégradation entraîne la formation de corps apoptotiques et par conséquent l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose [370]. Il nous semble donc intéressant d'étudier si la fodrine est impliquée dans le mécanisme par lequel l'isoforme B220 de CD45 régule négativement l'adressage du récepteur P2X7. Des expériences de microscopie confocale seront réalisées afin d'étudier la colocalisation des protéines B220, de la fodrine et du récepteur P2X7 dans les lymphocytes T. Ensuite, nous étudierons, par western blot, si une dégradation de la

fodrine a lieu en réponse à l'ATP ou à la galectine-1 dans les lymphocytes T spléniques de souris.

ANNEXE

Loss of P2X7 Receptor Plasma Membrane Expression and Function in Pathogenic B220⁺ Double-Negative T Lymphocytes of Autoimmune MRL/*lpr* Mice

Sylvain M. Le Gall¹, Julie Legrand², Mohcine Benbijja^{1,2}, Hanaa Safya¹, Karim Benihoud³, Jean M. Kanellopoulos⁴, Pierre Bobé^{1,2*}

1 Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris Diderot, Paris, France, **2** Institut André Lwoff, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, Villejuif, France, **3** Institut Gustave Roussy, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 8203, Villejuif, France, **4** Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 8619, Orsay, France

Abstract

Lupus is a chronic inflammatory autoimmune disease influenced by multiple genetic loci including *Fas Ligand* (FasL) and *P2X7 receptor* (P2X7R). The Fas/Fas Ligand apoptotic pathway is critical for immune homeostasis and peripheral tolerance. Normal effector T lymphocytes up-regulate the transmembrane tyrosine phosphatase B220 before undergoing apoptosis. Fas-deficient MRL/*lpr* mice (*lpr* mutation) exhibit lupus and lymphoproliferative syndromes due to the massive accumulation of B220⁺ CD4⁺ CD8⁻ (DN) T lymphocytes. The precise ontogeny of B220⁺ DN T cells is unknown. B220⁺ DN T lymphocytes could be derived from effector CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, which have not undergone activation-induced cell death due to inactivation of Fas, or from a special cell lineage. P2X7R is an extracellular ATP-gated cell membrane receptor involved in the release of proinflammatory cytokines and TNFR1/Fas-independent cell death. P2X7R also regulate early signaling events involved in T-cell activation. We show herein that MRL/*lpr* mice carry a *P2X7R* allele, which confers a high sensitivity to ATP. However, during aging, the MRL/*lpr* T-cell population exhibits a drastically reduced sensitivity to ATP- or NAD-mediated stimulation of P2X7R, which parallels the increase in B220⁺ DN T-cell numbers in lymphoid organs. Importantly, we found that this B220⁺ DN T-cell subpopulation has a defect in P2X7R-mediated responses. The few B220⁺ T cells observed in normal MRL^{+/+} and C57BL/6 mice are also resistant to ATP or NAD treatment. Unexpectedly, while P2X7R mRNA and proteins are present inside of B220⁺ T cells, P2X7R are undetectable on the plasma membrane of these T cells. Our results prompt the conclusion that cell surface expression of B220 strongly correlates with the negative regulation of the P2X7R pathway in T cells.

Citation: Le Gall SM, Legrand J, Benbijja M, Safya H, Benihoud K, et al. (2012) Loss of P2X7 Receptor Plasma Membrane Expression and Function in Pathogenic B220⁺ Double-Negative T Lymphocytes of Autoimmune MRL/*lpr* Mice. PLoS ONE 7(12): e52161. doi:10.1371/journal.pone.0052161

Editor: George C. Tsokos, Beth Israel Deaconess Medical Center, United States of America

Received: May 10, 2012; **Accepted:** November 12, 2012; **Published:** December 21, 2012

Copyright: © 2012 Le Gall et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Centre Nationale de la Recherche Scientifique and grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0089-02). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Co-authors PB and JK are PLOS ONE Editorial Board members. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: pierre.bobe@u-psud.fr

Introduction

MRL/*lpr* mice develop a severe autoimmune syndrome that closely resembles human systemic lupus erythematosus (SLE), and exhibit a lymphoproliferative syndrome due to the *lpr* mutation of the death receptor Fas. The *lpr* mutation leads to the accumulation of a subset of TCR $\alpha\beta$ ⁺ B220⁺ CD4⁺ CD8⁻ T lymphocytes (hereafter referred to as B220⁺ double negative (DN) T cells). The precise ontogeny of B220⁺ DN T cells is unknown. They could be derived either from CD4⁺ or CD8⁺ T cells, which despite antigen stimulation have not undergone activation-induced cell death phenomenon due to the defective *fas* gene [1,2], or from a special cell lineage [3]. Accumulation of B220⁺ DN T cells in the *lpr* mouse appears to require the transcription factor eomesodermin [4]. Normal CD4⁺ or CD8⁺ effector T cells up-regulate the B220 isoform of CD45 (or CD45RABC) prior to apoptosis [5,6]. CD45 is a transmembrane protein tyrosine phosphatase expressed at high levels on all nucleated hematopoietic cells [7]. When Fas or Fas ligand (FasL) expression is defective, effector T cells down-

regulate CD4 or CD8 molecules but retain the expression of B220. Furthermore, *lpr* mutation results in a massive up-regulation of FasL on both T cells [8] and B cells [9], enabling them to kill Fas⁺ targets *in vitro*. The *lpr* mutation being leaky [10], FasL overexpression on MRL/*lpr* lymphocytes could be responsible for a non-antigen-specific autoimmune attack on organs expressing low levels of Fas. Indeed, we have demonstrated previously the ability of MRL/*lpr* T cells overexpressing FasL to induce non-antigen-specific killing *in vivo* [11,12], and we have also shown that *in vivo* elimination of these FasL⁺ T cells using arsenic trioxide (As₂O₃) administration cured or prevented autoimmune diseases [13]. However, the *lpr* mutation cannot account for the entire autoimmune syndrome of MRL/*lpr* mice because C57BL/6 (B6) mice bearing the *lpr* mutation develop a lymphoproliferation, but a limited lupus-like syndrome [14]. Lupus is a polygenic disorder and a large number of susceptibility genes are identified in SLE and mouse models of spontaneous lupus [15,16]. Interestingly, the

purinergic receptor P2X7 (P2X7R) might be a susceptibility locus for lupus [17,18].

P2X7R belongs to the P2X receptor family of ATP-gated cation channels [19]. Brief activation of P2X7R with high concentrations of ATP (>100 μ M) opens cation-specific ion channels on the cell surface. Prolonged activation of P2X7R results in the formation of nonselective membrane pores, permeable to molecules of molecular mass up to 900 Da. Continuous ATP stimulation of P2X7R leads to cell death [20–22]. Depending on the cell type, numerous physiological functions have been attributed to P2X7R: maturation and secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-18, IL-6 and TNF- α [23–26], shedding of the transmembrane molecules CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes [27] by activation of metalloproteinases ADAM10 and 17 [28], killing of different intracellular pathogens in macrophages [29,30], and cell death [20–22]. P2X7R also regulates the early signaling events involved in T-cell activation. Upon antigen stimulation, T lymphocytes release intracellular ATP, which induces Ca²⁺ influx, NF-AT activation, and IL-2 production through P2X7R activation [31–33].

Here, we report that the T-lymphocyte population from autoimmune MRL/lpr mice becomes more resistant with age to ATP-induced shedding of CD62L, pore formation, phosphatidylserine (PS) exposure, and cell death. This resistance is independent of the P2X7R gene polymorphism because the P2X7R allele in MRL/lpr and MRL^{+/+} mice is identical to the one from BALB/c mice, known to confer high sensitivity to stimulation by ATP [21]. The severe decrease in P2X7R activity in T lymphocytes parallels the increase in B220⁺ DN T lymphocyte numbers. The *in vivo* elimination of pathogenic B220⁺ DN T lymphocytes in MRL/lpr mice after treatment with As₂O₃ unmasked the activation of P2X7R by ATP in the remaining B220⁺ T-lymphocyte populations. Using a rabbit polyclonal antiserum against P2X7R, we were able to show that the resistance of B220⁺ T lymphocytes to ATP treatment is due to a dramatic decrease in P2X7R cell surface expression. Importantly, the few activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from normal MRL^{+/+} and B6 mice, which have upregulated B220 prior to apoptosis, are also resistant to ATP treatment, suggesting that B220 is a negative regulator of the ATP/P2X7R pathway in T cells. Our present data lead us to hypothesize that the defect in the homeostasis of activated T cells due to the inactivation of the Fas/FasL pathway is greatly amplified by the deregulated activity of P2X7R in the B220-expressing activated T cells. Since dysregulation of T cell homeostasis is emerging as a major contributor to autoimmune disease, we discuss the role of Fas, P2X7R and CD45 in the pathology of the autoimmune MRL/lpr strain.

Materials and Methods

Mice

Wild-type MRL/MpJ (MRL^{+/+}), Fas deficient MRL/MpJ-Fas^{gpr/lpr/J} (MRL/lpr), C57BL/6J (B6), Fas-deficient B6.MRL-Fas^{gpr/lpr/J} (B6/lpr) and P2X7R-deficient C57BL/6 (B6^{P2X7R-/-}), seventh backcross on B6 mice originally from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) were maintained at the SEAT (Service des Animaux Transgéniques) animal facility. All the experiments were conducted in accordance with French (décret n°87 848) and European Economic Community (directive 86/609/CEE) guidelines for the care of laboratory animals and approved by the Ethical Committee of the SEAT - UPS44 CNRS (Villejuif, France).

Reagents

ATP (adenosine-5'-triphosphate), NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), ATP/ADPase apyrase, PMA (phorbol myristate acetate), KN-62 (1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine), Arsenic trioxide (As₂O₃) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ionomycin was from Calbiochem (EMD Biosciences Inc, San Diego, CA). Metalloprotease inhibitor GM6001 was purchased from Chemicon International (Temecula, CA), and inhibitor of zinc-dependent metalloproteinases Ro 31 9790 was kindly provided by Roche Palo Alto LLC (Palo Alto, CA).

Genetic Immunizations of Rabbits with Plasmid DNA

Encoding P2X7R

Rabbits were immunized against P2X7R by intramuscular electrotransfer of 400 μ g (1 μ g/ μ l in 0.9% NaCl) of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 containing mouse P2X7R cDNA. Animals were immunized three times at 3-week interval. Anti-P2X7R antisera were absorbed with spleen and thymus cells from B6^{P2X7R-/-} mice. The specificity of these antisera was established by comparing immunostaining for mouse P2X7R on Human Embryonic Kidney (HEK) cells and HEK cells transfected with cDNA coding for mouse P2X7R and on T lymphocytes from P2X7R^{+/+} and P2X7R^{-/-} mice. While these rabbit anti-P2X7R antisera immunoprecipitate P2X7R from P2X7R^{+/+} cell lysates, they do not work in western-blot [34]. Thus, the rabbit polyclonal anti-P2X7R antisera recognize P2X7R in its conformational form only, and are used for flow cytometric analysis.

Cell Preparation and Cell-surface Phenotyping

Spleen and lymph node (LN) cell suspensions prepared from 2 to 5-month-old mice were subjected to Ficol-Hypaque density gradient centrifugation to remove erythrocytes and dead cells. For phenotyping by flow cytometry and cell purification by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), spleen and LN cells were stained using either FITC-, PE- or biotin-conjugated mAb: rat anti-CD90.2, anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, anti-CD19, anti-CD39 (PharMingen, BD Biosciences or eBioscience, San Diego, CA). Plasma membrane-associated ADP-ribosyltransferase (ART)2.2 enzyme was detected using FITC-conjugated rat anti-mouse ART2.2 mAb (PharMingen). P2X7R was detected using rabbit polyclonal anti-P2X7R sera, generated by genetic immunization, and biotin-conjugated goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG absorbed against mouse immunoglobulins (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Rat IgG2a mAb was used as the isotype control (PharMingen). Use of mAb to mouse Fc γ receptor (PharMingen) avoided non-specific antibody binding.

Assays for CD62L Shedding, Pore Formation, PS Exposure and Calcium Influx

Spleen or LN cell suspensions were treated with ATP for 30 to 45 min at 37°C. In some experiments lymphoid cells were pretreated with P2X7R antagonist KN-62 for 15 min at 37°C before stimulation with ATP, NAD or PMA plus Ionomycin (PMA/Iono). Cells were then washed in PBS, and stained for 30 min on ice with phenotype-specific fluorescent mAbs, and with either FITC-conjugated anti-CD62L mAb (PharMingen), YO-PRO-1 fluorescent probe (Invitrogen-Molecular Probes, Cergy Pontoise, France), or FITC-conjugated Annexin V (Invitrogen-Molecular Probes) to assess CD62L shedding, pore formation, or cell surface PS exposure, respectively, by flow cytometry. For the measurement of calcium influx by flow cytometry, cells were loaded for 30 min at 37°C with calcium-reactive fluorescence

probe, Oregon Green 488 BAPTA-1 (Invitrogen-Molecular Probes). Cells were stained with phenotype-specific fluorescent mAbs (30 min on ice) prior to stimulation with ATP.

Cell Death Analysis

Spleen cell suspensions were treated with ATP or NAD at 37°C for 4 h. Cells were then stained with phenotype-specific fluorescent mAbs, and with 7-aminoactinomycin D (7-AAD, PharMingen) to assess cell viability by flow cytometry.

P2X7R Sequencing

Total RNA was extracted with RNeasy Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from individual MRL^{+/+} and MRL/*lpr* spleens, and 1 µg of each sample was reverse-transcribed into cDNA using a cDNA-synthesis kit (New England Biolabs, Evry, France). PCR were performed on cDNA using the FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and P2X7R forward primer (5'-ATG CCG GCT TGC TGC AGC TGG AAC GAT GTC TT-3') and P2X7R reverse primer (5'-TCA GTA GGG ATA CTT GAA GCC ACT GTA CTG CCC-3'). PCR products were gel-purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and nucleotide sequences were determined by MWG Biotech Company (Ebersberg, Germany).

Real-time RT-PCR

RNAs were extracted with RNeasy kit (Qiagen) from whole LN cells, CD90 CD19⁺ B cells as well as B220⁺ and B220 CD19 CD90⁺ T-cell subsets purified from LNs of individual B6, MRL^{+/+} and MRL/*lpr* mice by FACS. One µg of each sample was reverse-transcribed into cDNA using a cDNA-synthesis kit (New England Biolabs). PCR was conducted with the LightCycler system using the DNA-binding dye SYBR Green for the detection of PCR products (Roche Diagnostics). DNA amplification was performed using P2X7R forward primer (5'-AGC ACG AAT TAT GGC ACC GT-3') and P2X7R reverse primer (5'-CCC CAC CCT CTG TGA CAT TCT-3'). After being heated at 95°C for 8 min, cDNA were amplified for 40 cycles, each cycle consisting of 95°C for 15 s, 60°C for 5 s, and 72°C for 8 s. For melting curve analysis, samples were heated to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s with continuous fluorescence readings. The specificity of PCR products was confirmed by melting curve analysis and by running samples on agarose gels. Specific cDNA was quantified by standard curves based on known amounts of PCR-amplified P2X7R cDNA, which were 10 pg, 2 pg, 0.40 pg, 0.080 pg, 0.016 pg, 0.0032 pg and 0.00064 pg. The standards and the samples were simultaneously amplified using the same reaction master mixture.

Western Blot Analysis

LN cells from B6^{P2X7R-/-}, MRL^{+/+}, MRL/*lpr* mice as well as FACS-purified B220⁺ and B220⁻ T-cell subsets from individual MRL/*lpr* LNs were lysed in Tris-buffered saline (TBS) (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) containing 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and protease inhibitors (Roche Diagnostics) for 15 min on ice. Cell lysates were centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, and protein concentration in the supernatants was determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Equal amounts of proteins from each lysate were separated on NuPAGE 4-12% Bis-Tris gradient gels (Invitrogen) under nonreducing condition, and then electrotransferred to nitrocellulose membranes (Whatman/Schleicher & Schuell, Sigma-Aldrich). The membranes were blocked in TBS containing 3% nonfat dry milk and 0.2% Tween 20 for 1 h at room temperature and

subsequently incubated overnight at 4°C with affinity purified rabbit anti-P2X7R antibodies recognizing residues 576 to 595 of P2X7R (1:1000; Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel). Finally, blots were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2500; Pierce) for 1 h at room temperature, and protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence reagents (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce). Washings were performed in TBS containing 0.05% Tween 20. For reprobing with rabbit anti-actin antibodies (1:500; Sigma-Aldrich), the blots were first incubated in stripping buffer (Pierce) for 10 min at room temperature.

Statistical Analysis

Data are reported as mean ± SE. Comparisons between untreated and ATP- or NAD-treated groups were made by Student's t-test. Statistical difference was accepted at $P \leq 0.05$.

Results

Impaired P2X7R Activity in T Cells from Autoimmune MRL/*lpr* Mice

P2X7R stimulation by ATP results in PS exposure, pore formation, shedding of transmembrane molecules and cell death. Here we compared the sensitivity to ATP stimulation of T cells from autoimmune MRL/*lpr* mice with their counterparts from normal B6 and MRL^{+/+} mice. Measurements of pore formation (YO-PRO-1 uptake), CD62L shedding, PS exposure on cell surface (Annexin V staining) and cell death (7-AAD staining) in ATP-treated spleen cells were performed simultaneously with cell phenotyping. Stimulation by 500 µM ATP of spleen cells from B6 (not shown) and MRL^{+/+} mice triggered CD62L shedding (Fig. 1A), YO-PRO-1 uptake (Fig. 1B), and Annexin V (Fig. 1C) and 7-AAD (Fig. 1D) staining in CD90⁺ T cells. In contrast, the CD90⁺ T cells from autoimmune MRL/*lpr* did not respond to 500 µM ATP (Figs. 1A, 1B, 1C and 1D). Furthermore, using the ATP/ADP-degrading enzyme apyrase and KN-62, a potent pharmacological antagonist of P2X7R, we confirmed that P2X7R stimulation is implicated in CD62L shedding and pore opening in MRL^{+/+} T cells. Upon treatment with 500 µM ATP, 79% of MRL^{+/+} T cells released CD62L and 45% incorporated YO-PRO-1 vs. 12% and 0.45%, respectively, when cells were treated with 500 µM ATP plus 20 U/ml apyrase. Similarly, pretreatment of MRL^{+/+} spleen cells by KN-62 inhibited ATP-induced CD62L shedding (Fig. 2A) and YO-PRO-1 uptake (Fig. 2B) in T cells in a dose-dependent manner.

MRL^{+/+} spleen cells required for stimulation a high concentration of ATP because P2X7R displays a low affinity to this ligand (typically ≥ 100 µM) compared with other P2XR [35]. To determine whether T cells from MRL/*lpr* mice require an even higher dose of ATP to be stimulated than those from MRL^{+/+}, we conducted dose response experiments with ATP ranging from 100-5000 µM (Fig. 3A). In MRL^{+/+} T cells, CD62L shedding was observed at a half-maximal effective concentration (EC₅₀) of 170 µM ATP, while MRL/*lpr* T cells were totally resistant to stimulation by ATP, at any dose tested. Consistently, in B6^{P2X7R-/-} T cells, ATP had no effect on CD62L shedding, indicating that this effect is dependent on P2X7R (Fig. 3A). The resistance of MRL/*lpr* T cells to ATP-induced CD62L shedding is also obvious when CD62L expression is depicted as an average fluorescence intensity per cell (mean fluorescence intensity, MFI) (Fig. 3B) instead of the percentage of CD62L⁺ T cells (Figs. 1, 2 and 3A). Indeed, even at the highest dose of ATP, CD62L MFI values in MRL/*lpr* T lymphocytes remained unaffected by the treatment with ATP (Fig. 3B).

Loss of P2X7R Expression on B220⁺ T Cells

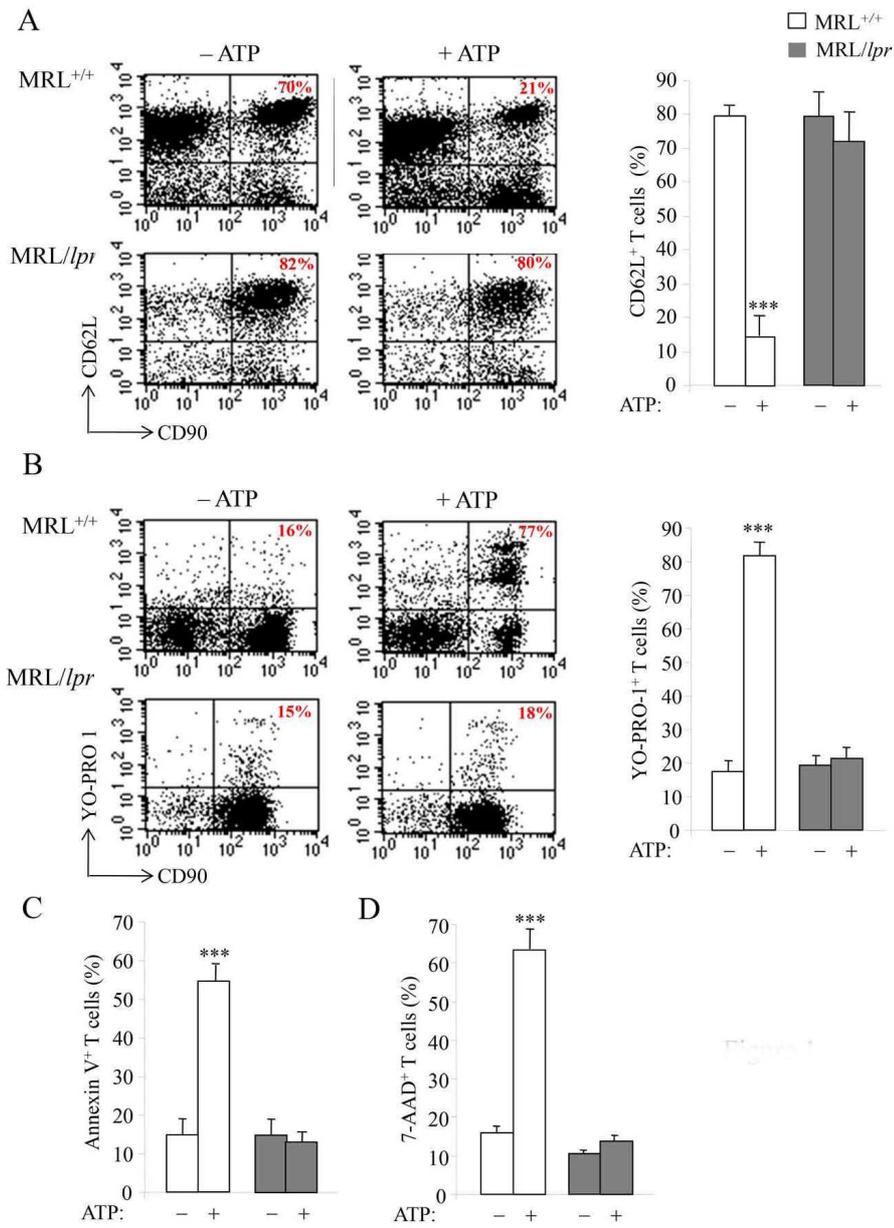


Figure 1. P2X7R activity in T lymphocytes from normal MRL^{+/+} and autoimmune MRL/lpr mice. Spleen cells from 3 to 4-mo-old MRL^{+/+} (□) and MRL/lpr (■) mice (n=5 mice/group) were incubated with or without 500 μ M ATP for 45 min (A–C) or 4 h (D) at 37°C. Cells were then double-stained with anti-CD90 mAb and either anti-CD62L mAb, YO-PRO-1, Annexin V or 7-AAD to assess in T cells by flow cytometry: (A) CD62L shedding; (B) pore formation; (C) cell surface PS exposure; (D) cell death. Numbers reported in the dot plots indicate the percentages of CD62L⁺CD90⁺ or YO-PRO-1⁺CD90⁺ cells in the gated CD90⁺ T-cell population. Histograms correspond to the mean percentages \pm SE (n=5 mice/group) of double-stained cells in the gated CD90⁺ T-cell population. Asterisks denote statistically significant differences (***p=0.001) between ATP-stimulated and unstimulated groups.
doi:10.1371/journal.pone.0052161.g001

NAD also acts as a ligand for P2X7R through ART2.2 enzyme, which catalyzes the transfer of ADP-ribose from NAD to various cell surface proteins, among them the P2X7R [36]. Stimulation by 50 μ M NAD of MRL^{+/+} and MRL/lpr spleen cells induced CD62L shedding and PS exposure only on MRL^{+/+} T cells (Fig.

S1). As found with ATP, NAD is unable to promote P2X7R pathway activation in MRL/lpr T cells. This absence of CD62L shedding and PS exposure in NAD-treated MRL/lpr T cells is not due to a lower expression of ART2.2 because the percentage of ART2.2⁺-expressing T cells was similar in MRL/lpr (33 \pm 1.7%)

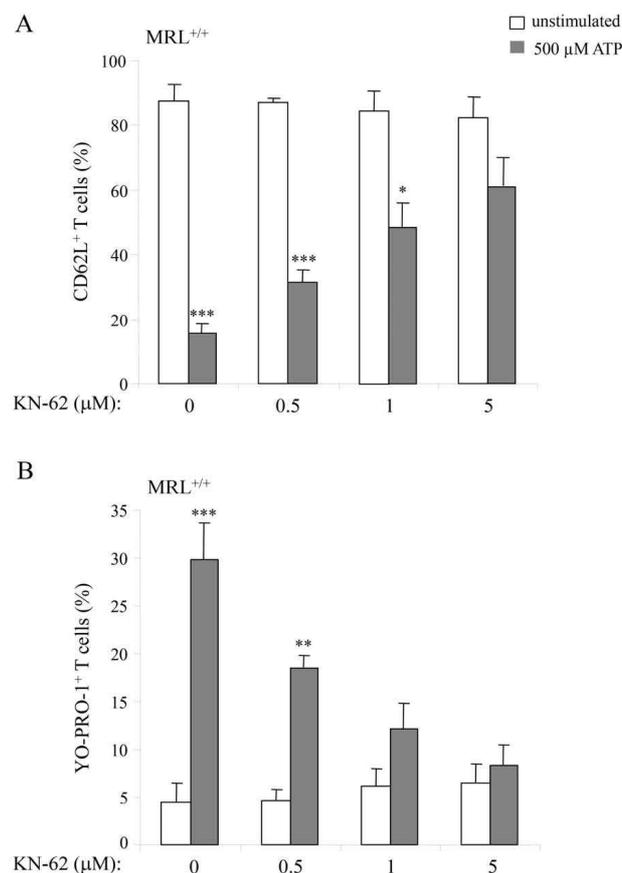


Figure 2. P2X7R antagonist KN-62 inhibits ATP-induced CD62L shedding and pore formation in MRL^{+/+} T lymphocytes. Spleen cells from 3 to 4-mo-old MRL^{+/+} mice (n=4 mice/group) were preincubated for 15 min at 37°C with or without 0.5, 1 and 5 μ M KN-62 and then stimulated with 500 μ M ATP for 30 min. Cells were then double-stained with anti-CD90 mAb and either anti-CD62L or YO-PRO-1 to assess by flow cytometry: (A) CD62L shedding or (B) pore formation in the gated CD90⁺ T-cell population stimulated (■) or not (□) with ATP. Asterisks denote statistically significant differences between ATP-stimulated and unstimulated groups: *p=0.05; **p=0.01; ***p=0.001.
doi:10.1371/journal.pone.0052161.g002

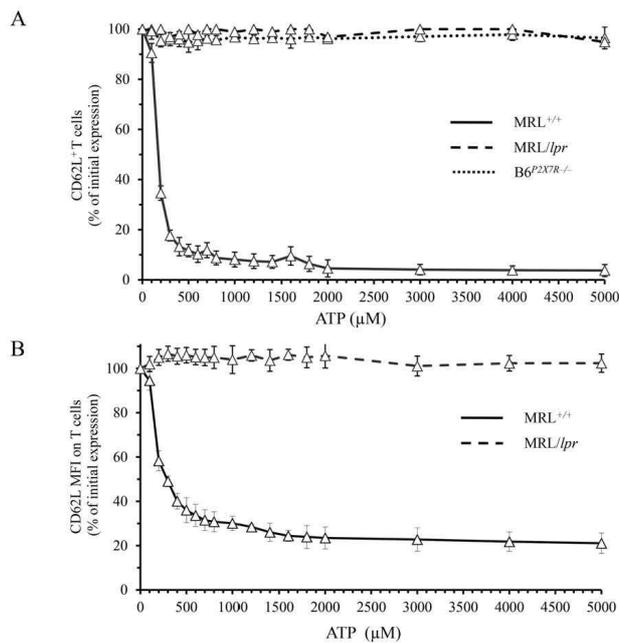


Figure 3. Dose-response experiments for ATP-induced CD62L shedding on T lymphocytes. Spleen cells from 3 to 4-mo-old MRL^{+/+} (solid line), MRL/lpr (dashed line) and P2X7-deficient B6^{P2X7R-/-} (dotted line) mice (n=3 mice/group) were treated for 45 min at 37°C with doses of ATP ranging from 100 to 5000 μM. Spleen cells were then triple-stained with anti-CD90, anti-CD19 and anti-CD62L mAb to assess by flow cytometry: (A) the percentage of CD62L-expressing CD19⁺CD90⁺ T cells and (B) MFI of CD62L on CD19⁺CD90⁺ T cells. Results are expressed as the mean percentage of initial expression ± SE.

doi:10.1371/journal.pone.0052161.g003

and MRL^{+/+} (29±2.5%) spleen cells as analyzed by flow cytometry using anti-ART2.2 mAb.

Taken altogether, these data show that ATP- or NAD-stimulated P2X7R events are dramatically impaired in T cells from autoimmune MRL/lpr mice.

PMA/Iono Induces Shedding of CD62L in ATP-insensitive MRL/lpr T Cells

Treatment of leukocytes with ATP or PMA is known to induce CD62L shedding via activation of the zinc-dependent membrane metalloprotease ADAM17 or TACE (TNF-α converting enzyme) [27,28]. However, PMA acts independently of the P2X7R pathway. Unlike ATP treatment, which activates CD62L shedding in T cells from MRL^{+/+}, but not from MRL/lpr mice, PMA/Iono treatment induces CD62L shedding in T cells from both MRL^{+/+} and MRL/lpr mice. The shedding of CD62L by ATP in MRL^{+/+} T cells, or by PMA/Iono in MRL^{+/+} and MRL/lpr T cells was prevented by the metalloprotease inhibitors GM6001 and Ro 31 9790 (Fig. 4), in a similar dose dependent-manner. These data show that while ADAM17 is present in T cells from both MRL^{+/+} and MRL/lpr mice, its activation by P2X7R signaling [28] is dramatically impaired in MRL/lpr T cells, and also partially reduced upon PMA/Iono treatment. This reduced processing

activity of CD62L in MRL/lpr T cells could be due to a general defect or repression of signalling activities in this strain.

The MRL Genetic Background Carries a High Sensitivity Allele of P2X7R

P2X7R is highly polymorphic [26]. In the common laboratory mouse strains B6 and DBA/2, and in the lupus-prone NZB mice, an allelic variation (P451L) in the C-terminal tail of P2X7R confers a low sensitivity to stimulation by ATP compared with BALB/c or NZW mice [17,21]. We determined the P2X7R allele present in the MRL genetic background by sequencing RT-PCR-amplified P2X7R products obtained from spleen cells of 7 independent MRL^{+/+} and MRL/lpr mice (data not shown). We found that the more responsive allele of P2X7R, the P451 isoform [21], is carried by the MRL genetic background and present in both MRL^{+/+} and MRL/lpr mice. Thus, an allelic variation cannot explain the differences in the levels of P2X7R signaling found between MRL^{+/+} and MRL/lpr mice.

ATP-induced P2X7R Activation is Blocked in B220⁺ T Cells Only

Unexpectedly, when comparing the responses of MRL/lpr and MRL^{+/+} spleen cells to ATP or NAD treatment measured by PS exposure (Fig. 5A) and pore formation (Fig. 5B), we found that the

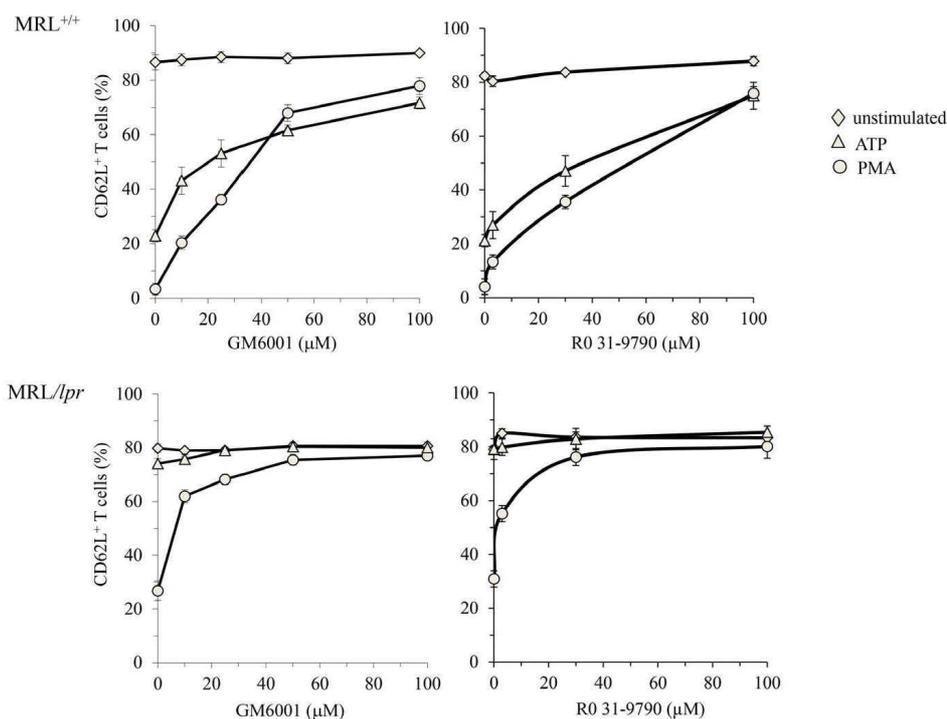


Figure 4. Metalloprotease inhibitors GM6001 and Ro 31-9790 inhibit PMA/iono- and ATP-induced shedding of CD62L on MRL^{+/+} T lymphocytes. Spleen cells from MRL^{+/+} and MRL^{lpr} mice ($n=5$ mice/group) were preincubated with or without 10, 25, 50, 100 μ M GM6001 or 3, 30, 100 μ M Ro 31-9790 for 15 min at 37°C, and then either left unstimulated (\square) or stimulated with 500 μ M ATP (\blacktriangle) or 5 ng/ml PMA plus 0.5 μ g/ml ionomycin (\circ) for 45 min at 37°C. Cells were subsequently stained with anti-CD90 and anti-CD62L mAb. Cell surface expression of CD62L was assessed in the gated CD90⁺ T cells by flow cytometry. doi:10.1371/journal.pone.0052161.g004

deficiency of P2X7R activity in MRL^{lpr} mice is age-related. Remarkably, the lack of ATP or NAD responsiveness in MRL^{lpr} mice can be reproducibly observed at later stages of the disease (4-mo-old), but is not seen in younger MRL^{lpr} mice (2-mo-old) at earlier stages of the autoimmune syndrome (Figs. 5A and 5B). Since MRL^{+/+} (4-mo-old) spleen T cells respond to ATP or NAD treatment, the weaker response of spleen T cells from 4-mo-old MRL^{lpr} mice to stimulation by ATP or NAD is probably due to intrinsic change in the lymphocyte subsets *i.e.* the appearance of high percentage of B220⁺ DN T cells in the spleen of MRL^{lpr} mice. The B220⁺ DN T-cell subset is present at a very low frequency in spleen and LNs from 1-mo-old MRL^{lpr} mice, and the frequency of this subset increases with age to become predominant in 3 to 4-mo-old MRL^{lpr} mice (Table 1). Since As₂O₃ specifically eliminates B220⁺ DN T cells in MRL^{lpr} mice as we had shown previously [13], we examined whether T cells from As₂O₃-treated MRL^{lpr} mice remained refractory to P2X7R stimulation, or whether they behaved like MRL^{+/+} T cells when challenged with ATP. In experiments starting at 2 months of age, MRL^{+/+} and MRL^{lpr} mice were treated with a daily injection of

As₂O₃ (5 μ g/g body weight) or PBS for two months. As shown above, spleen cells from 4-mo-old PBS-treated MRL^{lpr} mice were resistant to 500 μ M ATP. In contrast, spleen from 4-mo-old As₂O₃-treated MRL^{lpr} mice totally free of B220⁺ DN T cells responded to ATP treatment as efficiently as MRL^{+/+} T cells (Fig. S2), indicating that the lack of responsiveness to stimulation by ATP or NAD observed in T cells from MRL^{lpr} mice at later stages of the disease is due to the accumulation of B220⁺ DN T cells with impaired P2X7R functions.

During aging B220⁺ DN T cells accumulate in *lpr* LNs and spleen and dilute out conventional T cells. Thus, B220⁺ DN T cells represent 70.40 \pm 11.55% and 26.2 \pm 4.25% of the T-cell population in 3 to 4-mo-old MRL^{lpr} mice and 5-mo-old B6/*lpr* mice, respectively. As expected, a small number of B220⁺ T cells (either CD4⁺, CD8⁺ or DN) were found in 4-mo-old wild-type MRL^{+/+} and B6 mice (Table 1). Their specific behaviour regarding stimulation by ATP is masked by the response of B220⁺ T cells. Therefore, we have examined the activity of P2X7R in B220⁺ CD90⁺ and B220⁺ CD90⁻ T-cell subsets from normal MRL^{+/+} mice and autoimmune MRL^{lpr} mice. Stimulation by

ATP or NAD of the B220 CD90⁺ T-cell subset from MRL/*lpr* and MRL^{+/+} mice triggered CD62L shedding (Fig. 5C), pore formation (Fig. 5D), cell death (Fig. 5E), and calcium influx (Fig. 6). P2X7R is indeed involved in these cellular events because pretreatment of MRL/*lpr* spleen cells by the P2X7R antagonist KN-62 inhibited ATP-induced CD62L shedding and pore formation in B220 CD90⁺ T cells in a dose-dependent manner (Fig. S3). In contrast, B220⁺CD90⁺ T cells are not activated by ATP or NAD in any mouse strain tested (MRL^{+/+}, MRL/*lpr*, B6, B6/*lpr*) (Figs. 5C, 5D, 5E, 6 and 7). Furthermore, we compared the sensitivity to ATP of B220 CD4⁺ and B220 CD8⁺ T cells from MRL^{+/+}, MRL/*lpr*, B6 and B6/*lpr* mice with their counterparts expressing the B220 molecule (Fig. 7A and 7B). Importantly, whatever the phenotype of the CD90⁺ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) and their genetic origin (either MRL^{+/+}, MRL/*lpr*, B6 or B6/*lpr*), the cell surface expression of B220 molecules strictly correlated with an impaired cleavage of CD62L following stimulation by ATP, which indicates an absence of P2X7R signaling.

CD39 Expression Levels on B220⁺ and B220⁻ T Cells

CD39/ENTPD1, an ectoenzyme that degrades extracellular ATP to AMP, is highly expressed on the majority of monocytes and B cells and a fraction of CD4⁺ T cells, but not on CD8⁺ T cells [37]. To examine whether the loss of P2X7R response of the B220⁺ T cells is due to enhanced hydrolysis of ATP following CD39 overexpression, we have analysed the levels of CD39 membrane expression in CD19⁺ B cells, B220 CD90⁺ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) and B220⁺CD90⁺ DN T cells from MRL/*lpr* mice. Flow cytometry analyses show that CD39 levels are significantly higher on B220 CD4⁺ T cells than in B220 CD8⁺ T cells and B220⁺ DN T cells (Fig. 8A). Since B220⁺CD4⁺ T cells from MRL/*lpr* mice respond to exogenously added ATP though expressing high levels of CD39 at the plasma membrane, it is very unlikely that a lower level of CD39 expression on B220⁺ DN T cells could account for the lack of activation of P2X7R in B220⁺ T lymphocytes.

P2X7R is not Expressed on the Cell Surface of B220⁺ T Cells

The level of P2X7R membrane expression is a limiting factor for signaling, and correlate with the threshold of activation of P2X7R [38]. Therefore, we quantified P2X7R at mRNA and protein levels by real-time RT-PCR, western blot and flow cytometry in LN cells or FACS-purified B220⁺ and B220⁻ CD90⁺ T lymphocytes from B6, MRL^{+/+}, MRL/*lpr* and B6^{P2X7R-/-} mice. RT-PCR and western blot analyses show that B220⁺ T cells

from MRL/*lpr* mice express high levels of P2X7R mRNA (Fig. 8B) and proteins (Fig. 8C) that were similar or even higher than in B220⁻ T cells. As expected, no P2X7R proteins were detected in B6^{P2X7R-/-} mice (Fig. 8C). The absence of P2X7R activity in MRL/*lpr* T cell population did not seem to correlate with a lower expression of P2X7R protein. Therefore, we examined whether the absence of P2X7R response in B220⁺ T cells could be due to reduced expression of P2X7R at the plasma membrane. Using rabbit polyclonal antiserum that recognizes conformational epitope on P2X7R and flow cytometry, we determined the expression of P2X7R on B220⁻ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) from MRL^{+/+} (Fig. 8D) and MRL/*lpr* mice as well as on B220⁻ expressing CD4⁺, CD8⁺ and DN T-cell subsets from MRL/*lpr* mice (Fig. 8E). The staining patterns obtained with CD4⁺ and CD8⁺ T cells from B6^{P2X7R-/-} mice were used to set background fluorescence for P2X7R expression, as shown in MRL^{+/+} plots (Fig. 8D). B220⁻ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) from MRL^{+/+} and MRL/*lpr* mice expressed P2X7R, albeit at different levels (based on MFI values) (Fig. 8D and 8E). In contrast, no P2X7R labeling was observed on B220⁺ DN T cells as well as on B220 positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells from MRL/*lpr* mice (Fig. 8E), indicating that the defect in P2X7R signaling in B220⁺ T cells is due to a lack of P2X7R at the cell surface.

Discussion

Our present study shows that 1) the B220⁺ DN T cells that accumulate in spleen and LNs of autoimmune MRL/*lpr* mice due to the *fas* mutation have an impaired P2X7R pathway, 2) the few B220⁺CD4⁺ and B220⁺CD8⁺ T cells found in the spleen and LNs of normal B6 and MRL^{+/+} mice have also an impaired P2X7R pathway, 3) while similar levels of P2X7R proteins are detected by western blot in LN cells from MRL^{+/+} and MRL/*lpr* mice, flow cytometric analysis revealed that P2X7R were not actually expressed on the plasma membrane of B220⁺ T cells (either CD4⁺, CD8⁺ or DN). Our present report supports the following important points: first, the loss of P2X7R activity in B220⁺ DN T cells from MRL/*lpr* mice could amplify the defect in peripheral T cell homeostasis due to the *fas* mutation and thus contribute to the autoimmune pathology. However, the role of P2X7R in SLE is difficult to evaluate since several other loci are involved in the development and severity of the disease [15,16]. Second, the lower activity of P2X7R in normal B220⁺ T cells could be a physiological regulatory mechanism.

During infections, protective immunity produces inflammatory cytokines and killer cells to destroy invading microorganisms, but also causes the destruction of normal cells. Infected or stressed cells release ATP into the extracellular compartment, which activates

Table 1. Percentages of the different T-cell subsets in LNs from MRL^{+/+}, MRL/*lpr*, B6 and B6/*lpr* mice.

T-cell subsets	MRL ^{+/+} (n = 15)*	"young" MRL/ <i>lpr</i> (n = 10)**	"old" MRL/ <i>lpr</i> (n = 15)*	B6 (n = 5)***	B6/ <i>lpr</i> (n = 5)***
B220 ⁺ CD4 ⁺	47.38±2.50	49.11±3	12.56±3.89	51.05±1.25	35.51±5.25
B220 ⁺ CD8 ⁺	45.22±1.55	33.15±5.3	14.16±3.45	44.10±2.22	31.12±4.75
B220 ⁻ CD4 ⁺	4.62±1.45	4.02±1.98	3.43±2.55	3.25±0.95	7.9±1.06
B220 ⁻ CD8 ⁺	2.78±0.81	2.91±0.97	0.85±0.65	1.58±0.31	1.63±0.46
B220 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	1.37±0.25	13.39±4.2	70.40±11.55	1.06±0.12	26.2±4.25

*3 to 4-mo-old MRL^{+/+} and MRL/*lpr* mice, n represents the number of mice per group.

**1 ½ to 2-mo-old MRL/*lpr* mice.

***5-mo-old B6 and B6/*lpr* mice.

doi:10.1371/journal.pone.0052161.t001

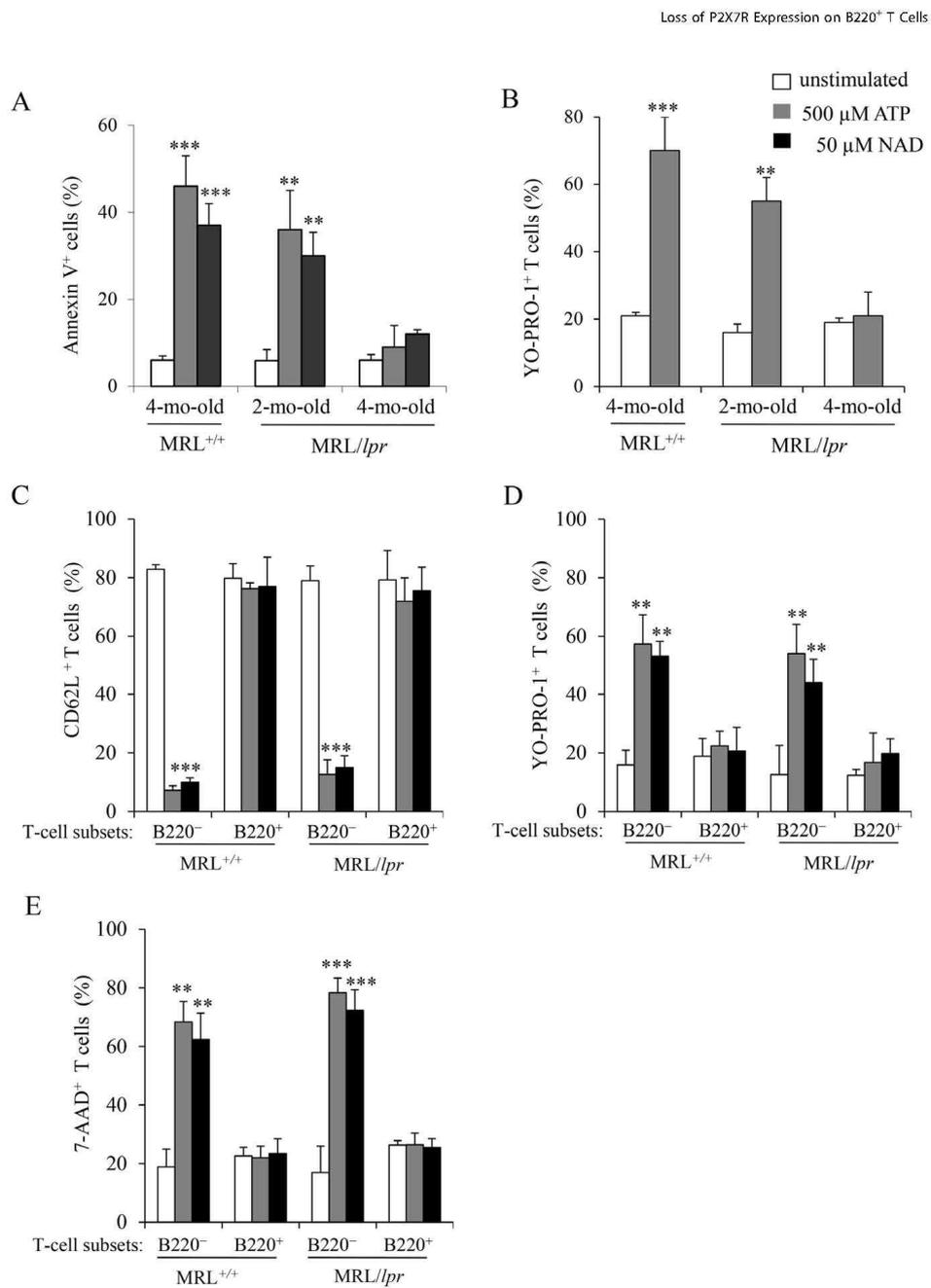


Figure 5. P2X7R activity in T lymphocytes from MRL/lpr mice at early and late stages of the disease, and in B220⁺ and B220⁻ T lymphocytes from MRL^{+/+} and MRL/lpr mice. (A and B) Spleen cells from 4-mo-old MRL^{+/+} and 2- and 4-mo-old MRL/lpr mice (n = 3 mice/group) were either left unstimulated (□) or stimulated with 500 μM ATP (■) or 50 μM NAD (■) for 45 min at 37°C. Cells were then double-stained with anti-CD90 mAb and either Annexin V or YO-PRO-1 to assess PS exposure and pore formation, respectively, in the gated CD90⁺ T-cell population by flow cytometry. (C–E) Spleen cells from 3 to 5-mo-old MRL^{+/+} and MRL/lpr (n = 5 mice/group) were either left unstimulated (□) or stimulated with 500 μM ATP (■) or 50 μM NAD (■) for 45 min at 37°C. Cells were then triple-stained with anti-CD90, anti-B220 and either anti-CD62L mAb, YO-PRO-1 or 7-AAD to assess CD62L shedding (C), pore formation (D) or cell death (E) in B220⁺CD90⁺ and B220⁻CD90⁺ T-cell subsets. Asterisks denote statistically significant differences between ATP- or NAD-stimulated and unstimulated groups: **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0052161.g005

P2X7R. P2X7R activation on immune cells causes inflammation, including cytokine secretion and dendritic cell activation [39]. P2X7R activation also induces shedding of LN homing receptor CD62L from the cell surface of leukocytes [27,40], regulating leukocyte extravasation in inflamed tissues. Furthermore, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg), which are resistant to apoptosis via their antigen receptor, die *in vivo* in the presence of extracellular ATP [41,42] or NAD [43], enabling a more efficient immune response in inflammatory sites. However, human and murine CD4⁺ Treg could be protected, to some extent, from cell death induced by extracellular ATP or NAD because they constitutively express ATP/ADPase CD39, AMPase CD73, and NADase CD38 on the plasma membrane [37,43,44]. Indeed, Tregs play a critical role in maintaining immune homeostasis and preventing autoimmune diseases [45], and their elimination by extracellular ATP and NAD might be responsible for breaking tolerance in inflamed tissues. Other subsets of regulatory T cells

have been identified: CD8⁺ T cells, natural killer T (NKT) cells and DN T cells [3,46]. DN Tregs are generated in the periphery during a primary immune response, and kill effector T cells in an antigen-specific manner through Fas/FasL interactions [3,46]. Interestingly, it has been suggested that part of the B220⁺ DN T cells found in autoimmune MRL/lpr mice represents Treg cells [47,48].

Autoimmune disease also arises from defective homeostatic regulation of effector T cells [1]. It is largely recognized, that human and murine effector T cells upregulate B220 molecules before undergoing apoptosis by the Fas pathway [5,6,49]. In MRL/lpr mice or ALPS patients, effector T cells overexpress B220 at their surface though the Fas pathway is defective. The significant association between the overexpression of B220 and loss of P2X7R expression we identified on T cells from both wild-type and Fas-deficient mice lead us to suggest that purinergic P2X7R is involved in a T-cell homeostatic pathway different of

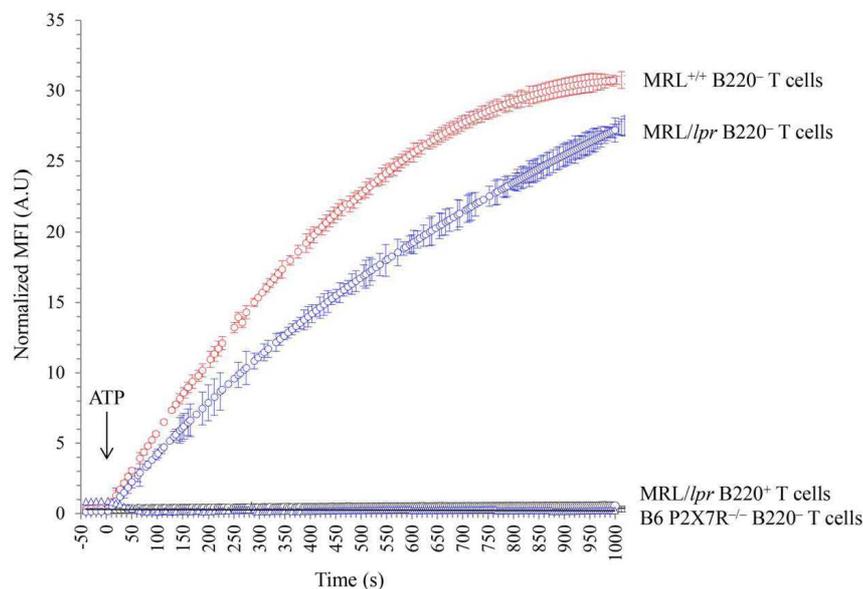


Figure 6. Real-time kinetic analysis of calcium influx in B220⁻ and B220⁺ T lymphocytes stimulated with ATP. Spleen cells from 4-mo-old MRL^{+/+} (red) MRL/lpr (blue) and B6^{P2X7R-/-} (black) mice (n = 3 mice/group) were loaded with calcium-reactive fluorescence probe, Oregon Green 488 BAPTA-1. After loading, cells were stained with anti-CD90, anti-CD19 and anti-B220 mAbs. Baseline MFI of the calcium probe was recorded in the gated B220⁻CD90⁺ (○) and B220⁺CD90⁺ (△) T cells during 50 s by flow cytometry, and was followed by the addition of 500 μM ATP (at time t₀, arrow). Changes over time in MFI values of the calcium probe were monitored in the T-cell subsets by flow cytometry. MFI values were normalized by subtracting the baseline MFI. doi:10.1371/journal.pone.0052161.g006

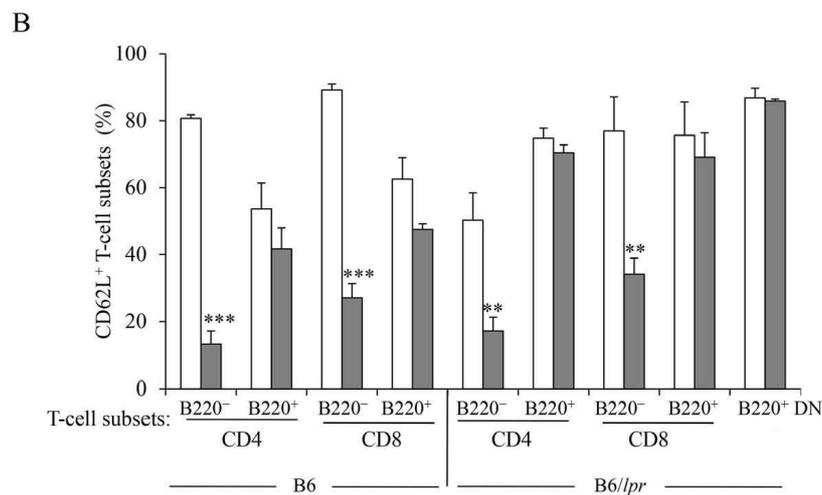
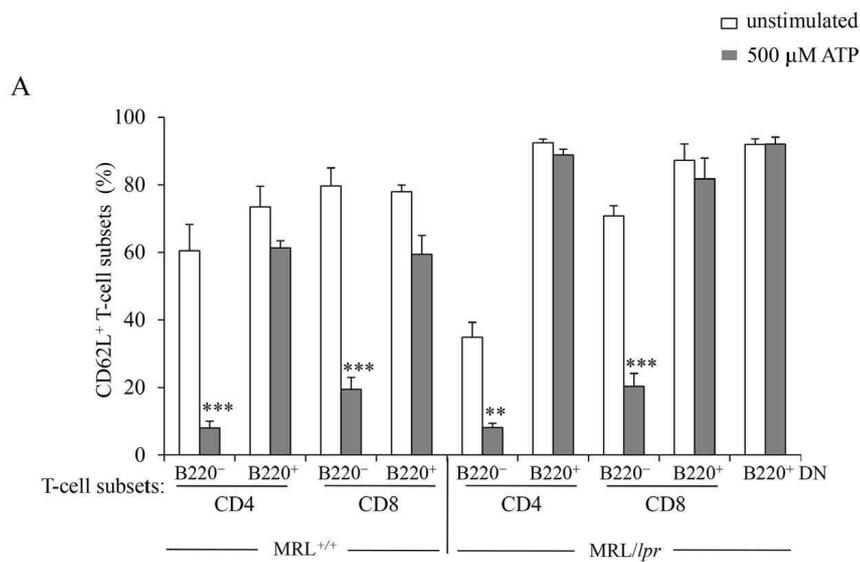
Loss of P2X7R Expression on B220⁺ T Cells

Figure 7. ATP-induced shedding of CD62L in CD4⁺, CD8⁺ and DN T lymphocytes expressing the transmembrane tyrosine phosphatase B220. Spleen cells from 3 to 5-mo-old MRL^{+/+}, MRL/lpr, B6 and B6/lpr mice (n = 5 mice/group) were either left unstimulated (□) or stimulated with 500 μM ATP (■) for 45 min at 37°C. Spleen cells were then stained with anti-CD90, anti-B220, anti-CD62L and anti-CD4 or anti-CD8 mAb to assess CD62L expression on B220⁻ and B220⁺ CD90⁺ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) from MRL^{+/+}, MRL/lpr, B6 and B6/lpr mice as well as on B220⁺ DN CD90⁺ T cells from MRL/lpr and B6/lpr mice. Asterisks denote statistically significant differences between ATP-stimulated and unstimulated groups: **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0052161.g007

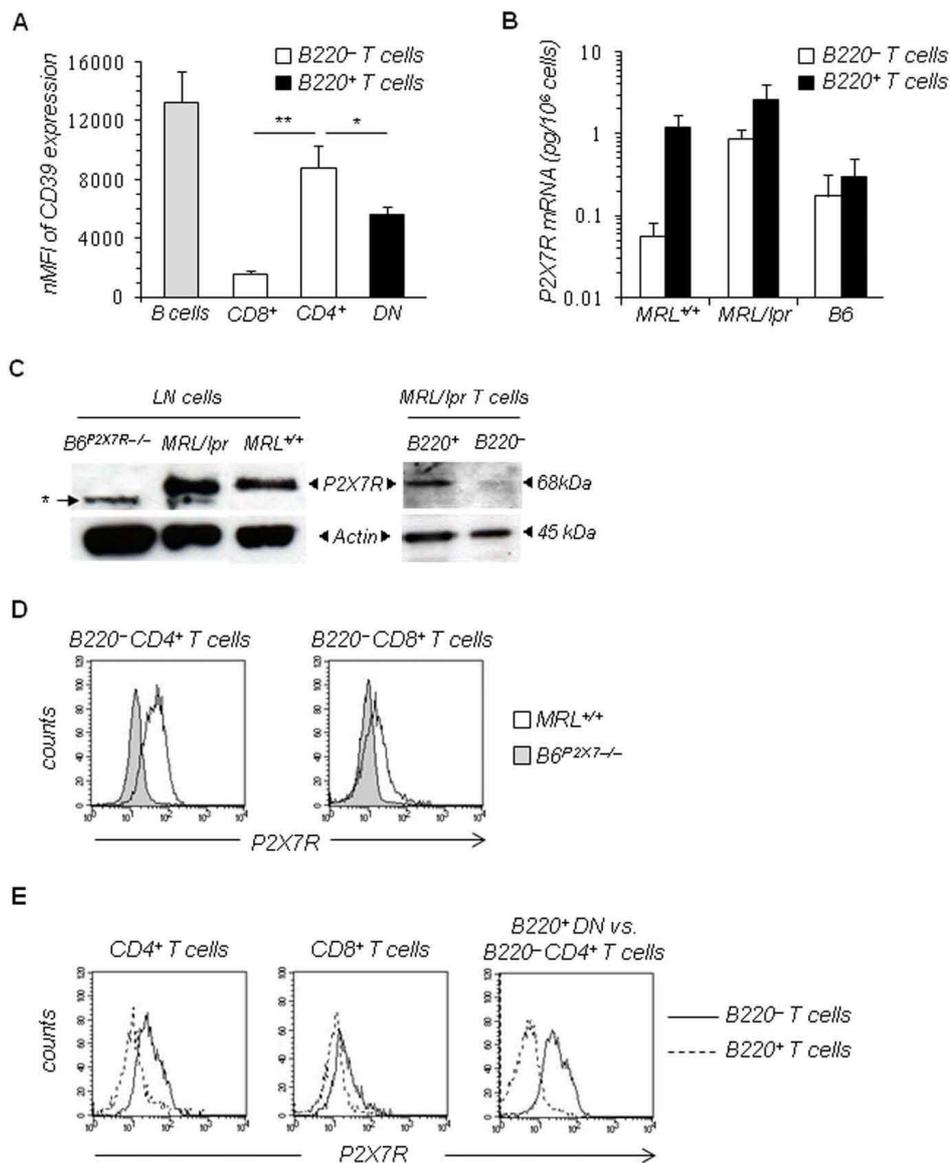


Figure 8. Expression of P2X7R and CD39 in T-cell subsets. (A) The levels of CD39 expression on B220⁻ (either CD4⁺ or CD8⁺) (□) and B220⁺ DN (■) T-cell subsets as well as on CD19⁺ B cells (■) from MRL/lpr mice (n=3) were analyzed by flow cytometry. Results shown on histogram are normalized MFI (nMFI) calculated as MFI of positive cells × percentage of positive cells. Asterisks denote statistically significant differences between B220⁺ DN T cells or B220⁻CD8⁺ T cells and B220⁻CD4⁺ T cells: **p*≤0.05; ***p*≤0.01. (B) P2X7R mRNA expression was analyzed in FACS-purified B220⁻ (□) and B220⁺ (■) CD19⁺CD90⁺ T-cell subsets from individual B6, MRL^{+/+} and MRL/lpr mice by real-time RT-PCR. Specific P2X7R cDNA was quantified

by standard curves based on known amounts of PCR-amplified P2X7R cDNA. Data are expressed as amount (pg) of P2X7R RNA per cell, and histograms represent the mean \pm SE of three independent experiments (n = 8 mice/group). (C) P2X7R protein levels in whole LN cells from 3 to 4-month-old MRL^{+/+}, MRL/lpr and B6^{P2X7R-/-} mice, and FACS-sorted B220⁺ and B220⁺ CD19⁺ CD90⁺ T-cell subsets from MRL/lpr mice were analyzed by western blotting using affinity-purified rabbit anti-P2X7R polyclonal antibodies (1:1000; Alomone Laboratories). A non-specific band (*) is frequently observed with this polyclonal antibody [22]. The blot was stripped and reprobed with anti-actin mAb. (D and E) Flow cytometric analysis of P2X7R expression levels on B220⁺ and B220⁺ T-cell subpopulations. Spleen cells from MRL^{+/+}, MRL/lpr and B6^{P2X7R-/-} mice (n = 3 mice/group) were stained with anti-CD90 mAb, anti-B220 mAb, rabbit polyclonal anti-P2X7R antiserum (1:100) generated by genetic immunization [34] and with either anti-CD4 mAb, anti-CD8 mAb or anti-CD4 plus anti-CD8 mAbs. (D) Overlay histograms showing the expression levels of P2X7R on gated CD4 T cells or CD8 T cells from MRL^{+/+} mice (open histogram) and B6^{P2X7R-/-} mice (shaded histogram). (E) Overlay histograms comparing the expression levels of P2X7R on B220⁺ (-) and B220⁺ (-) T cells, either CD4⁺ (left) or CD8⁺ (middle), from MRL/lpr mice. Right, overlay histogram comparing the expression levels of P2X7R on B220⁺ DN T cells (-) and B220⁺ CD4⁺ T cells (-) from MRL/lpr mice. The results shown are representative of at least four independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0052161.g008

that of death receptor Fas. The inactivation of the P2X7R pathway in B220⁺ DN T cells could amplify in MRL/lpr mice the lymphadenopathy due to impaired Fas-mediated apoptosis. Indeed, when effector T cells acquire B220 surface expression, they are protected from death triggered by extracellular ATP or NAD released by inflamed tissues and unable to cleave CD62L, although ADAM17 protease responsible for CD62L shedding [28] is functional in these T cells (Fig. 4). Therefore, they are able to return to LNs where they accumulate.

Interestingly, another isoform of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 has been found to be associated with the regulation of P2X7R functions. The sensitivity of CD4⁺ T cells to ATP-induced PS externalization and cell death appears to correlate with the levels of CD45RB membrane expression. CD4⁺ T cells expressing low levels of CD45RB are more responsive to ATP stimulation than their counterpart expressing high levels of CD45RB [42,50]. High and low levels of CD45RB expression on mouse T cells are a feature of naive cells and antigen-activated cells, respectively [7,51], suggesting that activated T cells (CD45RB^{low}) are more sensitive to ATP stimulation than naive T cells (CD45RB^{high}). In B220⁺ (or CD45RABC^{high}) DN T cells, we exclude a role for CD45RB in the loss of P2X7R functions since B220⁺ DN T display a central memory (CD45RB^{int}CD62L^{high}CD44^{high}) phenotype [7,52].

In summary, mutations in a single gene, namely *fas*, promote a T-cell lymphoproliferation and the constitutive expression of B220 on T cells, which correlates with a marked downregulation of cell surface P2X7R expression and, therefore, an impaired functionality of P2X7R. The high numbers of abnormal B220⁺ DN T cells in MRL/lpr mice totally mask the response of normal B220⁺ T-cell subsets (CD4⁺ or CD8⁺) to P2X7R stimulation. Elimination of these pathogenic B220⁺ DN T cells *in vivo* by As₂O₃ treatment restored the response of MRL/lpr T-cell population to P2X7R stimulation and normal T-cell homeostasis. Likewise, a previous report had shown that the inactivation of B220 in FasL-deficient mice improved the lymphoproliferative disorder [53]. A number of susceptibility loci for SLE have been mapped, but the key question is how each genetic factor contributes to the disease. We hypothesize that the defect in the homeostasis of activated *lpr* T cells, due to the inactivation of the Fas/FasL pathway, is amplified by the impaired activity of P2X7R in B220⁺ T cells.

Supporting Information

Figure S1 NAD-induced shedding of CD62L and PS externalization in T lymphocytes from MRL^{+/+} and

References

1. Bidere N, Su HC, Lenardo MJ (2006) Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 24: 321–352.

MRL/lpr mice. Spleen cells from MRL^{+/+} and MRL/lpr mice (n = 3 mice/group) were either left unstimulated (□) or stimulated with 50 μ M NAD (■) for 45 min at 37°C. Cells were then double-stained with anti-CD90 mAb and either anti-CD62L mAb or Annexin V to assess CD62L shedding and PS exposure, respectively, in the gated CD90⁺ T-cell population by flow cytometry.

(TIF)

Figure S2 P2X7R activity in T lymphocytes from normal MRL^{+/+} and autoimmune MRL/lpr mice treated by arsenic trioxide for two months. Two-month-old MRL^{+/+} (□) and MRL/lpr (■) mice (n = 3 mice/group) have been treated five days a week for 2 months with PBS or As₂O₃ (5 μ g/g). Spleen cells from treated mice were then incubated with or without 500 μ M ATP for 45 min at 37°C. Spleen cells were then triple-stained with anti-CD90 and anti-CD19 mAb and either anti-CD62L mAb or YO-PRO-1 to assess CD62L shedding (A) and pore formation (B), respectively, in CD19⁺ CD90⁺ T cells by flow cytometry. Asterisks denote statistically significant differences between ATP-stimulated and unstimulated groups: ****p* ≤ 0.001.

(TIF)

Figure S3 P2X7R antagonist KN-62 inhibits ATP-induced CD62L shedding and pore formation in B220⁺ T cells from MRL/lpr mice. Spleen cells from 3-month-old MRL/lpr mice preincubated at 37°C for 15 min with or without 0.5, 1 and 5 μ M P2X7R inhibitor KN-62 were stimulated or not by 500 μ M ATP for 45 min at 37°C. Cells were then triple-stained with anti-CD90, anti-B220 and either anti-CD62L mAb or YO-PRO-1 to assess CD62L shedding (A) or pore formation (B) in B220⁺ (□) and B220⁺ (■) CD90⁺ T cells. Results are representative of three independent experiments.

(TIF)

Acknowledgments

We thank Danielle Bonardelle for technical assistance (CNRS, Institut André Lwoff, Villejuif, France) and Dr Colette Kanellopoulos-Langevin (CNRS, Institut Jacques Monod, Paris, France) for critical review of our manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PB SL. Performed the experiments: SL JL MB HS. Analyzed the data: PB SL JK. Contributed reagents/materials/analysis tools: KB JK. Wrote the paper: PB SL.

3. Thomson CW, Lee BF, Zhang L (2006) Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol Res* 35: 163–178.
4. Kinjo I, Gordon SM, Intlekofer AM, Dowdell K, Mooney EC, et al. (2010) Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor c-myc. *J Immunol* 185: 7151–7155.
5. Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, et al. (1998) Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* 28: 540–547.
6. Blessing JJ, Morrow MR, Uzel G, Fleisher TA (2001) Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* 213: 72–81.
7. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21: 107–137.
8. Benihoud K, Bonardelle D, Bobé P, Kiger N (1997) MRL/lpr CD4 CD8 and CD8⁺ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol* 27: 415–420.
9. Bonardelle D, Benihoud K, Kiger N, Bobé P (2005) B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J Leukoc Biol* 78: 1052–1059.
10. Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, et al. (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* 11: 294–300.
11. Bobé P, Bonardelle D, Reynés M, Godeau F, Mahiou J, et al. (1997) Fas-mediated liver damage in MRL hemopoietic chimeras undergoing lpr-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol* 159: 4197–4204.
12. Bonardelle D, Bobé P, Reynés M, Amouroux J, Tricottet V, et al. (2001) Inflammatory arthropathy in MRL hemopoietic chimeras undergoing Fas mediated graft-versus-host syndrome. *J Rheumatol* 28: 956–961.
13. Bobé P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MK (2006) Arsenic trioxide: a promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* 108: 3967–3975.
14. Izui S, Kelley VE, Masuda K, Yoshida H, Roths JB, et al. (1984) Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice. *J Immunol* 133: 227–233.
15. Benihoud K, Bonardelle D, Soual-Hoehle E, Durand-Gasselin I, Emille D, et al. (2002) Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain. *Oncogene* 21: 5593–5600.
16. Morel L (2010) Genetics of SLE: evidence from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 6: 348–357.
17. Elliott JI, McVey JH, Higgins CF (2005) The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis Res Ther* 7: R468–475.
18. Portales-Cervantes L, Nino-Moreno P, Doniz-Padilla L, Baranda-Candido L, Garcia-Hernandez M, et al. (2010) Expression and function of the P2X7 purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 71: 818–825.
19. North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013–1067.
20. Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* 519 Pt 2: 335–346.
21. Adriouch S, Cox G, Welge V, Seman M, Koch-Nothe F, et al. (2002) Cutting edge: a natural P45IL mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* 169: 4108–4112.
22. Auger R, Matta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM (2005) A Role for Mitogen-activated Protein Kinase/Erk1/2 Activation and Non-selective Pore Formation in P2X7 Receptor-mediated Thymocyte Death. *J Biol Chem* 280: 28142–28151.
23. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrusova N, et al. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *J Biol Chem* 276: 125–132.
24. Labasi JM, Petrusova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, et al. (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168: 6436–6445.
25. Colomar A, Marty V, Medina C, Combe C, Parnet P, et al. (2003) Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J Biol Chem* 278: 30732–30740.
26. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, et al. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176: 3877–3883.
27. Gu B, Bendall LJ, Wiley JS (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92: 946–951.
28. Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Hortuchi K, Niu XD, et al. (2009) ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins such as TGF alpha, L-Selectin and TNF alpha. *Mol Biol Cell* 20: 1785–1794.
29. Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, et al. (1997) ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* 7: 433–444.
30. Coutinho-Silva R, Stahl L, Raymond MN, Jungas T, Verbeke P, et al. (2003) Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19: 403–412.
31. Loomis WH, Namiki S, Ostrom RS, Insel PA, Junger WG (2003) Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 278: 4590–4596.
32. Schenk U, Westendorf AM, Radzelli E, Casati A, Ferro M, et al. (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1: ra6.
33. Yip L, Woehle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, et al. (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23: 1685–1693.
34. Gonnord P, Delarasse C, Auger R, Benihoud K, Prigent M, et al. (2009) Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* 23: 795–805.
35. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, et al. (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53: 107–118.
36. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, et al. (2003) NAD⁺-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinergic receptor. *Immunity* 19: 571–582.
37. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Ushveva A, et al. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257–1265.
38. Tsukimoto M, Machata M, Harada H, Ikari A, Takagi K, et al. (2006) P2X7 Receptor-Dependent Cell Death Is Modulated during Murine T Cell Maturation and Mediated by Dual Signaling Pathways. *J Immunol* 177: 2842–2850.
39. Mariathasan S, Monack DM (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31–40.
40. Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, et al. (2003) Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* 19: 713–724.
41. Aswad F, Kawamura H, Dennert G (2005) High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* 175: 3075–3083.
42. Taylor SR, Alexander DR, Cooper JC, Higgins CF, Elliott JI (2007) Regulatory T Cells Are Resistant to Apoptosis via TCR but Not P2X7. *J Immunol* 178: 3474–3482.
43. Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huhn J, Sparwasser T, et al. (2010) Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* 207: 2561–2568.
44. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225–1232.
45. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160: 1212–1218.
46. Jiang H, Chess L (2006) Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 354: 1166–1176.
47. Ford MS, Young KJ, Zhang Z, Ohashi PS, Zhang L (2002) The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 196: 261–267.
48. Hamad AR, Mohamoud AS, Trujillo CJ, Huang CT, Yuan E, et al. (2003) B220⁺ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 171: 2421–2426.
49. Renno T, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR (1996) Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* 183: 431–437.
50. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassidy-Cain RL, et al. (2005) Membrane phosphatidylerine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* 7: 808–816.
51. Holmes N (2006) CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 117: 145–155.
52. Giese T, Davidson WF (1992) Evidence for early onset, polyclonal activation of T cell subsets in mice homozygous for lpr. *J Immunol* 149: 3097–3106.
53. Brooks WP, Lynes MA (2001) Effects of hemizygous CD45 expression in the autoimmune Fas(gld/gld) syndrome. *Cell Immunol* 212: 24–34.

BIBLIOGRAPHIE

1. Jacob F, Perez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K (2013) Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* 9: 285-306.
2. Coade SB, Pearson JD (1989) Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* 65: 531-537.
3. Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237.
4. Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80: 345-359.
5. Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. Raven Press, New York 80: 107-118.
6. Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N (1991) Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 142: 97-103.
7. Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, et al. (2005) Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* 31: 217-233.
8. Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC (2003) Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 278: 13468-13479.
9. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694.
10. Spray DC, Ye ZC, Ransom BR (2006) Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54: 758-773.
11. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, et al. (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23: 1685-1693.
12. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, et al. (2007) CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 3: 171-180.
13. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, et al. (2012) Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36: 362-373.
14. Deaglio S, Robson SC (2011) Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol* 61: 301-332.
15. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, et al. (2013) ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 32: 1743-1751.
16. Yegutkin GG, Wieringa B, Robson SC, Jalkanen S (2012) Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *FASEB J* 26: 3875-3883.
17. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, et al. (1994) The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 153: 3574-3583.
18. Heuts DP, Weissenborn MJ, Olkhov RV, Shaw AM, Gummadova J, et al. (2012) Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem* 13: 2384-2391.
19. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* 33: 231-237.
20. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225-1232.

BIBLIOGRAPHIE

21. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H, et al. (2002) CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 8: 358-365.
22. Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enyoji K, et al. (2007) Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol* 171: 1395-1404.
23. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19: 355-367.
24. Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, Balter L, Thompson LF, et al. (1998) Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 101: 295-300.
25. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL (2009) Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 346: 55-63.
26. Mills JH, Thompson LF, Mueller C, Waickman AT, Jalkanen S, et al. (2008) CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9325-9330.
27. Mills JH, Alabanza LM, Mahamed DA, Bynoe MS (2012) Extracellular adenosine signaling induces CX3CL1 expression in the brain to promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 9: 193.
28. Airas L, Niemela J, Yegutkin G, Jalkanen S (2007) Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine. *Ann N Y Acad Sci* 1110: 641-648.
29. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, Evans J, Eddaoudi A, et al. (2010) High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol* 185: 134-143.
30. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Huls S, Burghoff S, et al. (2011) Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C530-539.
31. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, et al. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257-1265.
32. Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, et al. (2007) Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol* 178: 8127-8137.
33. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Fogel U, et al. (2004) Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 95: 814-821.
34. Whiteside TL, Mandapathil M, Schuler P (2011) The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Curr Med Chem* 18: 5217-5223.
35. Thammavongsa V, Kern JW, Missiakas DM, Schneewind O (2009) Staphylococcus aureus synthesizes adenosine to escape host immune responses. *J Exp Med* 206: 2417-2427.
36. Russo-Abraham T, Cosentino-Gomes D, Gomes MT, Alviano DS, Alviano CS, et al. (2011) Biochemical properties of Candida parapsilosis ecto-5'-nucleotidase and the possible role of adenosine in macrophage interaction. *FEMS Microbiol Lett* 317: 34-42.
37. Sansom FM, Newton HJ, Crikis S, Cianciotto NP, Cowan PJ, et al. (2007) A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* 9: 1922-1935.
38. Fan J, Zhang Y, Chuang-Smith ON, Frank KL, Guenther BD, et al. (2012) Ecto-5'-nucleotidase: a candidate virulence factor in Streptococcus sanguinis experimental endocarditis. *PLoS One* 7: e38059.
39. Theatre E, Frederix K, Guilmain W, Delierneux C, Lecut C, et al. (2012) Overexpression of CD39 in mouse airways promotes bacteria-induced inflammation. *J Immunol* 189: 1966-1974.

BIBLIOGRAPHIE

40. Friedman DJ, Kunzli BM, Yi AR, Seigny J, Berberat PO, et al. (2009) From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16788-16793.
41. Bynoe MS, Waickman AT, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, et al. (2012) CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *J Biomed Biotechnol* 2012: 260983.
42. Chia JS, McRae JL, Thomas HE, Fynch S, Elkerbout L, et al. (2013) The protective effects of CD39 overexpression in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Diabetes* 62: 2026-2035.
43. Garcia-Hernandez MH, Portales-Cervantes L, Cortez-Espinosa N, Vargas-Morales JM, Fritche Salazar JF, et al. (2011) Expression and function of P2X(7) receptor and CD39/Entpd1 in patients with type 2 diabetes and their association with biochemical parameters. *Cell Immunol* 269: 135-143.
44. Sebastiao AM, Ribeiro JA (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci* 21: 341-346.
45. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhatsky A (2009) P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158: 137-148.
46. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev* 63: 1-34.
47. Burnstock G, Ralevic V (2014) Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 66: 102-192.
48. Hasko G, Pacher P (2008) A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol* 83: 447-455.
49. Linden J, Cekic C (2012) Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2097-2103.
50. Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7: 423-436.
51. Briddon SJ, Gandia J, Amaral OB, Ferre S, Lluís C, et al. (2008) Plasma membrane diffusion of G protein-coupled receptor oligomers. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2262-2268.
52. Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, et al. (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8606-8611.
53. Suzuki T, Namba K, Tsuga H, Nakata H (2006) Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 559-565.
54. Rivkees SA, Price SL, Zhou FC (1995) Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* 677: 193-203.
55. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492.
56. Headrick JP, Ashton KJ, Rose'meyer RB, Peart JN (2013) Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther* 140: 92-111.
57. Hammond LC, Bonnet C, Kemp PJ, Yates MS, Bowmer CJ (2004) Chronic hypoxia up-regulates expression of adenosine A1 receptors in DDT1-MF2 cells. *Biochem Pharmacol* 67: 421-426.
58. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V (2014) Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci* 15: 2024-2052.
59. Iredale PA, Hill SJ (1993) Increases in intracellular calcium via activation of an endogenous P2-purinoceptor in cultured CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 110: 1305-1310.
60. Ohta A, Madasu M, Kini R, Subramanian M, Goel N, et al. (2009) A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol* 183: 5487-5493.

BIBLIOGRAPHIE

61. Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J (2005) Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* 391: 575-580.
62. Morello S, Ito K, Yamamura S, Lee KY, Jazrawi E, et al. (2006) IL-1 beta and TNF-alpha regulation of the adenosine receptor (A2A) expression: differential requirement for NF-kappa B binding to the proximal promoter. *J Immunol* 177: 7173-7183.
63. Revan S, Montesinos MC, Naime D, Landau S, Cronstein BN (1996) Adenosine A2 receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase. *J Biol Chem* 271: 17114-17118.
64. Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, et al. (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7432-7436.
65. Linden J, Taylor HE, Robeva AS, Tucker AL, Stehle JH, et al. (1993) Molecular cloning and functional expression of a sheep A3 adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol Pharmacol* 44: 524-532.
66. Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG (1993) Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10365-10369.
67. Sajjadi FG, Boyle DL, Domingo RC, Firestein GS (1996) cDNA cloning and characterization of A3i, an alternatively spliced rat A3 adenosine receptor variant. *FEBS Lett* 382: 125-129.
68. Gupta YK, Malhotra J (1997) Adenosinergic system as an endogenous anticonvulsant mechanism. *Indian J Physiol Pharmacol* 41: 329-343.
69. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, et al. (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9407-9412.
70. Mediero A, Cronstein BN (2013) Adenosine and bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24: 290-300.
71. Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H (2007) Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption. *Am J Clin Nutr* 86: 240-244.
72. Kim SH, Nam EJ, Kim YK, Ye YM, Park HS (2010) Functional variability of the adenosine A3 receptor (ADORA3) gene polymorphism in aspirin-induced urticaria. *Br J Dermatol* 163: 977-985.
73. Tang Z, Diamond MA, Chen JM, Holly TA, Bonow RO, et al. (2007) Polymorphisms in adenosine receptor genes are associated with infarct size in patients with ischemic cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 82: 435-440.
74. Brown RA, Clarke GW, Ledbetter CL, Hurlle MJ, Denyer JC, et al. (2008) Elevated expression of adenosine A1 receptor in bronchial biopsy specimens from asthmatic subjects. *Eur Respir J* 31: 311-319.
75. Wilson CN, Nadeem A, Spina D, Brown R, Page CP, et al. (2009) Adenosine receptors and asthma. *Handb Exp Pharmacol*: 329-362.
76. Ellenbogen KA, O'Neill G, Prystowsky EN, Camm JA, Meng L, et al. (2005) Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson. *Circulation* 111: 3202-3208.
77. Kiesman WF, Elzein E, Zablocki J (2009) A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. *Handb Exp Pharmacol*: 25-58.
78. Lappas CM, Rieger JM, Linden J (2005) A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 174: 1073-1080.
79. Naganuma M, Wiznerowicz EB, Lappas CM, Linden J, Worthington MT, et al. (2006) Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J Immunol* 177: 2765-2769.
80. Nikolova M, Carriere M, Jenabian MA, Limou S, Younas M, et al. (2011) CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog* 7: e1002110.

BIBLIOGRAPHIE

81. Day YJ, Marshall MA, Huang L, McDuffie MJ, Okusa MD, et al. (2004) Protection from ischemic liver injury by activation of A2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G285-293.
82. Ohta A, Sitkovsky M (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414: 916-920.
83. Himer L, Csoka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Pocza T, et al. (2010) Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB J* 24: 2631-2640.
84. Kiss I, Oskolas H, Toth R, Bouillet P, Toth K, et al. (2006) Adenosine A2A receptor-mediated cell death of mouse thymocytes involves adenylate cyclase and Bim and is negatively regulated by Nur77. *Eur J Immunol* 36: 1559-1571.
85. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, et al. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388: 674-678.
86. Al Jaroudi W, Iskandrian AE (2009) Regadenoson: a new myocardial stress agent. *J Am Coll Cardiol* 54: 1123-1130.
87. de Lera Ruiz M, Lim YH, Zheng J (2014) Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target. *J Med Chem* 57: 3623-3650.
88. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, et al. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8: 75-79.
89. Figler RA, Wang G, Srinivasan S, Jung DY, Zhang Z, et al. (2011) Links between insulin resistance, adenosine A2B receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes* 60: 669-679.
90. Frick JS, MacManus CF, Scully M, Glover LE, Eltzschig HK, et al. (2009) Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. *J Immunol* 182: 4957-4964.
91. Hart ML, Jacobi B, Schittenhelm J, Henn M, Eltzschig HK (2009) Cutting Edge: A2B Adenosine receptor signaling provides potent protection during intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 182: 3965-3968.
92. Sun CX, Zhong H, Mohsenin A, Morschl E, Chunn JL, et al. (2006) Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest* 116: 2173-2182.
93. Blackburn MR, Volmer JB, Thrasher JL, Zhong H, Crosby JR, et al. (2000) Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J Exp Med* 192: 159-170.
94. Young HW, Molina JG, Dimina D, Zhong H, Jacobson M, et al. (2004) A3 adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 173: 1380-1389.
95. Sun CX, Young HW, Molina JG, Volmer JB, Schnermann J, et al. (2005) A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *J Clin Invest* 115: 35-43.
96. Grunebaum E, Cohen A, Roifman CM (2013) Recent advances in understanding and managing adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13: 630-638.
97. Wilson JM, Ross WG, Agbai ON, Frazier R, Figler RA, et al. (2009) The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J Immunol* 182: 4616-4623.
98. Wilson JM, Kurtz CC, Black SG, Ross WG, Alam MS, et al. (2011) The A2B adenosine receptor promotes Th17 differentiation via stimulation of dendritic cell IL-6. *J Immunol* 186: 6746-6752.
99. Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, et al. (2006) The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest* 116: 1913-1923.
100. Hua X, Kovarova M, Chason KD, Nguyen M, Koller BH, et al. (2007) Enhanced mast cell activation in mice deficient in the A2b adenosine receptor. *J Exp Med* 204: 117-128.

BIBLIOGRAPHIE

101. Zaynagetdinov R, Ryzhov S, Goldstein AE, Yin H, Novitskiy SV, et al. (2010) Attenuation of chronic pulmonary inflammation in A2B adenosine receptor knockout mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 564-571.
102. Kohno Y, Ji X, Mawhorter SD, Koshiba M, Jacobson KA (1996) Activation of A3 adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood* 88: 3569-3574.
103. Guo Y, Bolli R, Bao W, Wu WJ, Black RG, Jr., et al. (2001) Targeted deletion of the A3 adenosine receptor confers resistance to myocardial ischemic injury and does not prevent early preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 33: 825-830.
104. Ge ZD, Peart JN, Kreckler LM, Wan TC, Jacobson MA, et al. (2006) CI-IB-MECA [2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide] reduces ischemia/reperfusion injury in mice by activating the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1200-1210.
105. Samsel M, Dzierzbicka K (2011) Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates. *Pharmacol Rep* 63: 601-617.
106. Harden TK, Sesma JI, Fricks IP, Lazarowski ER (2010) Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 149-160.
107. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, et al. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 276: 41479-41485.
108. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, et al. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58: 281-341.
109. Bucheimer RE, Linden J (2004) Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol* 555: 311-321.
110. von Kugelgen I, Wetter A (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 310-323.
111. Idzko M, Ferrari D, Eltzhig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509: 310-317.
112. Hao Y, Ko WH (2014) Purinergic P2Y receptors in airway epithelia: from ion transport to immune functions. *Sheng Li Xue Bao* 66: 16-22.
113. Ferrari D, Idzko M, Dichmann S, Purlis D, Virchow C, et al. (2000) P2 purinergic receptors of human eosinophils: characterization and coupling to oxygen radical production. *FEBS Lett* 486: 217-224.
114. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, et al. (2007) Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 13: 913-919.
115. Douillet CD, Robinson WP, 3rd, Milano PM, Boucher RC, Rich PB (2006) Nucleotides induce IL-6 release from human airway epithelia via P2Y2 and p38 MAPK-dependent pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L734-746.
116. Flume PA, Van Devanter DR (2012) State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. *BMC Med* 10: 88.
117. Lau OC, Samarawickrama C, Skalicky SE (2014) P2Y receptor agonists for the treatment of dry eye disease: a review. *Clin Ophthalmol* 8: 327-334.
118. Potthoff SA, Stegbauer J, Becker J, Wagenhaeuser PJ, Duvnjak B, et al. (2013) P2Y2 receptor deficiency aggravates chronic kidney disease progression. *Front Physiol* 4: 234.
119. Zhang Z, Wang Z, Ren H, Yue M, Huang K, et al. (2011) P2Y(6) agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment. *J Immunol* 186: 5376-5387.
120. Khine AA, Del Sorbo L, Vaschetto R, Voglis S, Tullis E, et al. (2006) Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. *Blood* 107: 2936-2942.
121. Liu GD, Ding JQ, Xiao Q, Chen SD (2009) P2Y6 receptor and immunoinflammation. *Neurosci Bull* 25: 161-164.
122. Muller T, Bayer H, Myrtek D, Ferrari D, Soricter S, et al. (2005) The P2Y14 receptor of airway epithelial cells: coupling to intracellular Ca²⁺ and IL-8 secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 601-609.

BIBLIOGRAPHIE

123. Duhant X, Schandene L, Bruyins C, Gonzalez NS, Goldman M, et al. (2002) Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 169: 15-21.
124. Amisten S, Melander O, Wihlborg AK, Berglund G, Erlinge D (2007) Increased risk of acute myocardial infarction and elevated levels of C-reactive protein in carriers of the Thr-87 variant of the ATP receptor P2Y11. *Eur Heart J* 28: 13-18.
125. Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA (1961) Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 192: 531-532.
126. Erlinge D (2011) P2Y receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61: 417-439.
127. Wihlborg AK, Wang L, Braun OO, Eyjolfsson A, Gustafsson R, et al. (2004) ADP receptor P2Y12 is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1810-1815.
128. Liverani E, Rico MC, Yaratha L, Tsygankov AY, Kilpatrick LE, et al. (2014) LPS-induced systemic inflammation is more severe in P2Y12 null mice. *J Leukoc Biol* 95: 313-323.
129. Hazama A, Hayashi S, Okada Y (1998) Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Arch* 437: 31-35.
130. Fernandez-Alvarez J, Hillaire-Buys D, Loubatieres-Mariani MM, Gomis R, Petit P (2001) P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. *Pancreas* 22: 69-71.
131. Amisten S, Meidute-Abaraviciene S, Tan C, Olde B, Lundquist I, et al. (2010) ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y13 receptors in mice. *Diabetologia* 53: 1927-1934.
132. Ryan LM, Rachow JW, McCarty BA, McCarty DJ (1996) Adenosine triphosphate levels in human plasma. *J Rheumatol* 23: 214-219.
133. Lazarowski ER (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 8: 359-373.
134. Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151: 571-579.
135. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, et al. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519.
136. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-523.
137. North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067.
138. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460: 592-598.
139. Browne LE, Jiang LH, North RA (2010) New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31: 229-237.
140. Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485: 207-212.
141. Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* 37: 14845-14851.
142. Vial C, Roberts JA, Evans RJ (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25: 487-493.
143. Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280: 10759-10765.
144. Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, et al. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17: 3016-3028.
145. Dubyak GR, el-Moatassim C (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-606.

BIBLIOGRAPHIE

146. Nakazawa K, Fujimori K, Takanaka A, Inoue K (1990) An ATP-activated conductance in pheochromocytoma cells and its suppression by extracellular calcium. *J Physiol* 428: 257-272.
147. Li C, Peoples RW, Weight FF (1997) Mg²⁺ inhibition of ATP-activated current in rat nodose ganglion neurons: evidence that Mg²⁺ decreases the agonist affinity of the receptor. *J Neurophysiol* 77: 3391-3395.
148. Cloues R (1995) Properties of ATP-gated channels recorded from rat sympathetic neurons: voltage dependence and regulation by Zn²⁺ ions. *J Neurophysiol* 73: 312-319.
149. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36: 1285-1294.
150. King BF, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G (1996) Full sensitivity of P2X2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH. *Br J Pharmacol* 117: 1371-1373.
151. Egan TM, Samways DS, Li Z (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452: 501-512.
152. Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15485-15490.
153. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, et al. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-435.
154. Buell G, Michel AD, Lewis C, Collo G, Humphrey PP, et al. (1996) P2X1 receptor activation in HL60 cells. *Blood* 87: 2659-2664.
155. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, et al. (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53: 107-118.
156. Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, et al. (1995) Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 3: 283-289.
157. Nurden AT (2007) Does ATP act through P2X(1) receptors to regulate platelet activation and thrombus formation? *J Thromb Haemost* 5: 907-909.
158. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, et al. (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403: 86-89.
159. Lecut C, Frederix K, Johnson DM, Deroanne C, Thiry M, et al. (2009) P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J Immunol* 183: 2801-2809.
160. Greco NJ, Tonon G, Chen W, Luo X, Dalal R, et al. (2001) Novel structurally altered P(2X1) receptor is preferentially activated by adenosine diphosphate in platelets and megakaryocytic cells. *Blood* 98: 100-107.
161. Brown SG, Townsend-Nicholson A, Jacobson KA, Burnstock G, King BF (2002) Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 673-680.
162. Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM (1998) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54: 989-993.
163. Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J Neurochem* 92: 925-933.
164. Xu GY, Shenoy M, Winston JH, Mittal S, Pasricha PJ (2008) P2X receptor-mediated visceral hyperalgesia in a rat model of chronic visceral hypersensitivity. *Gut* 57: 1230-1237.
165. Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, et al. (1999) Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1171-1181.
166. Yan D, Zhu Y, Walsh T, Xie D, Yuan H, et al. (2013) Mutation of the ATP-gated P2X(2) receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2228-2233.
167. Brandle U, Spielmanns P, Osteroth R, Sim J, Surprenant A, et al. (1997) Desensitization of the P2X(2) receptor controlled by alternative splicing. *FEBS Lett* 404: 294-298.

BIBLIOGRAPHIE

168. Garcia-Guzman M, Stuhmer W, Soto F (1997) Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res Mol Brain Res* 47: 59-66.
169. Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA, Kawashima E (1997) Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci* 17: 6529-6533.
170. Coutinho-Silva R, Knight GE, Burnstock G (2005) Impairment of the splenic immune system in P2X(2)/P2X(3) knockout mice. *Immunobiology* 209: 661-668.
171. Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, et al. (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011-1015.
172. Burnstock G (2011) Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. *BJU Int* 107: 192-204.
173. Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J* 15: 55-62.
174. Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995) A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 375: 129-133.
175. Wang CZ, Namba N, Gono T, Inagaki N, Seino S (1996) Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 196-202.
176. Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, Murrell-Lagnado RD (2007) Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* 120: 3838-3849.
177. Musa H, Tellez JO, Chandler NJ, Greener ID, Maczewski M, et al. (2009) P2 purinergic receptor mRNA in rat and human sinoatrial node and other heart regions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 541-549.
178. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, et al. (2006) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 12: 133-137.
179. Boumechache M, Masin M, Edwardson JM, Gorecki DC, Murrell-Lagnado R (2009) Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J Biol Chem* 284: 13446-13454.
180. Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31-304.
181. Ryten M, Dunn PM, Neary JT, Burnstock G (2002) ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *J Cell Biol* 158: 345-355.
182. Calvert RC, Shabbir M, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ, et al. (2004) Immunocytochemical and pharmacological characterisation of P2-purinoceptor-mediated cell growth and death in PC-3 hormone refractory prostate cancer cells. *Anticancer Res* 24: 2853-2859.
183. White N, Burnstock G (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27: 211-217.
184. Cox JA, Barmina O, Voigt MM (2001) Gene structure, chromosomal localization, cDNA cloning and expression of the mouse ATP-gated ionotropic receptor P2X5 subunit. *Gene* 270: 145-152.
185. Compan V, Ulmann L, Stelmashenko O, Chemin J, Chaumont S, et al. (2012) P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci* 32: 4284-4296.
186. Le KT, Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem* 274: 15415-15419.
187. Duckwitz W, Hausmann R, Aschrafi A, Schmalzing G (2006) P2X5 subunit assembly requires scaffolding by the second transmembrane domain and a conserved aspartate. *J Biol Chem* 281: 39561-39572.

BIBLIOGRAPHIE

188. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483.
189. King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, et al. (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20: 4871-4877.
190. Le KT, Babinski K, Seguela P (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18: 7152-7159.
191. Antonio LS, Stewart AP, Varanda WA, Edwardson JM (2014) Identification of P2X2/P2X4/P2X6 heterotrimeric receptors using atomic force microscopy (AFM) imaging. *FEBS Lett* 588: 2125-2128.
192. Banfi C, Ferrario S, De Vincenti O, Ceruti S, Fumagalli M, et al. (2005) P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in patients undergoing heart transplantation, interaction with TNFalpha and potential role in myocardial cell death. *J Mol Cell Cardiol* 39: 929-939.
193. Erlinge D, Burnstock G (2008) P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 4: 1-20.
194. Cockcroft S, Gomperts BD (1980) The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochem J* 188: 789-798.
195. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735-738.
196. Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, et al. (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272: 5482-5486.
197. Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, et al. (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett* 439: 26-30.
198. Jiang LH, Baldwin JM, Roger S, Baldwin SA (2013) Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Mammalian P2X7 Receptor Functions and Contributions in Diseases, Revealed by Structural Modeling and Single Nucleotide Polymorphisms. *Front Pharmacol* 4: 55.
199. Stelmashenko O, Lalo U, Yang Y, Bragg L, North RA, et al. (2012) Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. *Mol Pharmacol* 82: 760-766.
200. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63: 641-683.
201. Bartlett R, Stokes L, Sluyter R (2014) The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacol Rev* 66: 638-675.
202. Adriouch S, Ohlrogge W, Haag F, Koch-Nolte F, Seman M (2001) Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribose)transferase 2 and a downstream effector. *J Immunol* 167: 196-203.
203. Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, et al. (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J* 22: 861-869.
204. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, et al. (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19: 571-582.
205. Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, et al. (2009) NAD⁺ and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol* 182: 2898-2908.
206. Krebs C, Adriouch S, Braasch F, Koestner W, Leiter EH, et al. (2005) CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. *J Immunol* 174: 3298-3305.
207. Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Malone K, Kaslow H, et al. (2005) P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *J Immunol* 174: 1971-1979.
208. Hara N, Terashima M, Shimoyama M, Tsuchiya M (2000) Mouse T-cell antigen rt6.1 has thiol-dependent NAD glycohydrolase activity. *J Biochem* 128: 601-607.
209. Hong S, Schwarz N, Brass A, Seman M, Haag F, et al. (2009) Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular nicotinamide adenine dinucleotide and ecto-ADP-ribosyltransferases in murine macrophages and T cells. *J Immunol* 183: 578-592.

BIBLIOGRAPHIE

210. Kefalas P, Saxty B, Yadollahi-Farsani M, MacDermot J (1999) Chemotaxin-dependent translocation of immunoreactive ADP-ribosyltransferase-1 to the surface of human neutrophil polymorphs. *Eur J Biochem* 259: 866-871.
211. Haag F, Koch-Nolte F, Kuhl M, Lorenzen S, Thiele HG (1994) Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J Mol Biol* 243: 537-546.
212. Okamoto S, Azhipa O, Yu Y, Russo E, 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.
213. Haag F, Freese D, Scheublein F, Ohlrogge W, Adriouch S, et al. (2002) T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD. *Dev Immunol* 9: 197-202.
214. Kahl S, Nissen M, Girisch R, Duffy T, Leiter EH, et al. (2000) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* 165: 4463-4469.
215. Hong S, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, et al. (2007) Lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IFN-beta induce expression of the thiol-sensitive ART2.1 Ecto-ADP-ribosyltransferase in murine macrophages. *J Immunol* 179: 6215-6227.
216. Rissiek B, Danquah W, Haag F, Koch-Nolte F (2014) Technical Advance: a new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells. *J Leukoc Biol* 95: 543-549.
217. Elssner A, Duncan M, Gavrillin M, Wewers MD (2004) A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol* 172: 4987-4994.
218. Seil M, Kabre E, Nagant C, Vandenbranden M, Fontanils U, et al. (2010) Regulation by CRAMP of the responses of murine peritoneal macrophages to extracellular ATP. *Biochim Biophys Acta* 1798: 569-578.
219. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Forchap S, Sitta B, et al. (2004) The antibiotic polymyxin B modulates P2X7 receptor function. *J Immunol* 173: 4652-4660.
220. Norenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plotz T, Fischer W, et al. (2012) Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 167: 48-66.
221. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF (2009) Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 157: 1203-1214.
222. Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58: 82-88.
223. Qiu F, Dahl G (2009) A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C250-255.
224. Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, et al. (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48: 178-183.
225. Matute C, Torre I, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Alberdi E, et al. (2007) P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 27: 9525-9533.
226. Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D, Colaianna M, Idzko M, et al. (2009) Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J Immunol* 182: 4378-4385.
227. Takenouchi T, Sekiyama K, Sekigawa A, Fujita M, Waragai M, et al. (2010) P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58: 91-96.
228. Young MT, Pelegrin P, Surprenant A (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol* 71: 92-100.
229. Michel AD, Clay WC, Ng SW, Roman S, Thompson K, et al. (2008) Identification of regions of the P2X(7) receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. *Br J Pharmacol* 155: 738-751.

BIBLIOGRAPHIE

230. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Castro NG, Coutinho-Silva R, Guimaraes MZ (2011) Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *Br J Pharmacol* 163: 912-926.
231. Li M, Silberberg SD, Swartz KJ (2013) Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E3455-3463.
232. Yan Z, Khadra A, Sherman A, Stojilkovic SS (2011) Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. *J Gen Physiol* 138: 437-452.
233. Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78: 327-346.
234. Lenertz LY, Gavala ML, Zhu Y, Bertics PJ (2011) Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunol Res* 50: 22-38.
235. Garcia-Huerta P, Diaz-Hernandez M, Delicado EG, Pimentel-Santillana M, Miras-Portugal MT, et al. (2012) The specificity protein factor Sp1 mediates transcriptional regulation of P2X7 receptors in the nervous system. *J Biol Chem* 287: 44628-44644.
236. Humphreys BD, Dubyak GR (1998) Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol* 64: 265-273.
237. Welter-Stahl L, da Silva CM, Schachter J, Persechini PM, Souza HS, et al. (2009) Expression of purinergic receptors and modulation of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFN γ in human epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1788: 1176-1187.
238. Gadeock S, Tran JN, Georgiou JG, Jalilian I, Taylor RM, et al. (2010) TGF- β 1 prevents up-regulation of the P2X7 receptor by IFN- γ and LPS in leukemic THP-1 monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1798: 2058-2066.
239. Muzzachi S, Blasi A, Ciani E, Favia M, Cardone RA, et al. (2013) MED1101: a new dialdehydic compound regulating P2x7 receptor cell surface expression in U937 cells. *Biol Cell* 105: 399-413.
240. Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86: 369-408.
241. Feske S (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7: 690-702.
242. Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, et al. (2008) Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9: 432-443.
243. Bogeski I, Kummerow C, Al-Ansary D, Schwarz EC, Koehler R, et al. (2010) Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci Signal* 3: ra24.
244. Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484.
245. Bootman MD (2012) Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a011171.
246. Chaigne-Delalande B, Lenardo MJ (2014) Divalent cation signaling in immune cells. *Trends Immunol* 35: 332-344.
247. Lee M, Park J (2006) Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol Cells* 22: 1-7.
248. Fracchia KM, Pai CY, Walsh CM (2013) Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front Immunol* 4: 324.
249. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33: 3557-3566.
250. Yan Z, Liang Z, Obsil T, Stojilkovic SS (2006) Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. *J Biol Chem* 281: 32649-32659.
251. Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, et al. (2005) Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* 16: 3260-3272.

BIBLIOGRAPHIE

252. Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, et al. (2009) Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* 284: 10120-10128.
253. Budagian V, Bulanova E, Brovko L, Orinska Z, Fayad R, et al. (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.
254. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, et al. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300: 135-139.
255. Lajdova I, Chorvat D, Jr., Spustova V, Chorvatova A (2004) 4-Aminopyridine activates calcium influx through modulation of the pore-forming purinergic receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 50-56.
256. Lajdova I, Oksa A, Chorvat D, Jr., Topor P, Spustova V (2012) Purinergic P2X7 receptors participate in disturbed intracellular calcium homeostasis in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 35: 48-57.
257. Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A (1999) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* 519 Pt 2: 335-346.
258. Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, et al. (2002) Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* 169: 4108-4112.
259. Tomasinsig L, Pizzirani C, Skerlavaj B, Pellegatti P, Gulinelli S, et al. (2008) The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *J Biol Chem* 283: 30471-30481.
260. Pelegrin P (2011) Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br J Pharmacol* 163: 908-911.
261. Baroja-Mazo A, Barbera-Cremades M, Pelegrin P (2013) The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1828: 79-93.
262. Li S, Tomic M, Stojilkovic SS (2011) Characterization of novel Pannexin 1 isoforms from rat pituitary cells and their association with ATP-gated P2X channels. *Gen Comp Endocrinol* 174: 202-210.
263. Woehrle T, Yip L, Elkhali A, Sumi Y, Chen Y, et al. (2010) Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116: 3475-3484.
264. Aherne CM, Kewley EM, Eltzschig HK (2011) The resurgence of A2B adenosine receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1808: 1329-1339.
265. Chaumont S, Khakh BS (2008) Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12063-12068.
266. Schachter J, Motta AP, de Souza Zamorano A, da Silva-Souza HA, Guimaraes MZ, et al. (2008) ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci* 121: 3261-3270.
267. Cankurtaran-Sayar S, Sayar K, Ugur M (2009) P2X7 receptor activates multiple selective dye-permeation pathways in RAW 264.7 and human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 76: 1323-1332.
268. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF (2004) Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 1053-1061.
269. Faria RX, Defarias FP, Alves LA (2005) Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C260-271.
270. Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A (2005) Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem* 280: 33968-33976.
271. Vance JE, Tasseva G (2013) Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1831: 543-554.

BIBLIOGRAPHIE

272. Lentz BR (2003) Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* 42: 423-438.
273. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2006) Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 281: 29652-29659.
274. Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, et al. (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5: 191-199.
275. Wen LT, Caldwell CC, Knowles AF (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase activation and changes in Bax protein expression associated with extracellular ATP-mediated apoptosis in human embryonic kidney 293-P2X7 cells. *Mol Pharmacol* 63: 706-713.
276. Humphreys BD, Rice J, Kertesz SB, Dubyak GR (2000) Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 275: 26792-26798.
277. Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM (2005) A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 280: 28142-28151.
278. Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RD, Perfettini JL, Neto AC, et al. (1999) P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* 276: C1139-1147.
279. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, et al. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461: 282-286.
280. Aguirre A, Shoji KF, Saez JC, Henriquez M, Quest AF (2013) FasL-triggered death of Jurkat cells requires caspase 8-induced, ATP-dependent cross-talk between Fas and the purinergic receptor P2X(7). *J Cell Physiol* 228: 485-493.
281. Courageot MP, Lepine S, Hours M, Giraud F, Sulpice JC (2004) Involvement of sodium in early phosphatidylserine exposure and phospholipid scrambling induced by P2X7 purinoceptor activation in thymocytes. *J Biol Chem* 279: 21815-21823.
282. Aswad F, Kawamura H, Dennert G (2005) High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* 175: 3075-3083.
283. Taylor SR, Alexander DR, Cooper JC, Higgins CF, Elliott JI (2007) Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J Immunol* 178: 3474-3482.
284. Le Stunff H, Auger R, Kanellopoulos J, Raymond MN (2004) The Pro-451 to Leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X7 receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes. *J Biol Chem* 279: 16918-16926.
285. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, et al. (2005) Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* 7: 808-816.
286. Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Dewhurst S, Chimini G, Higgins CF, et al. (2008) Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol* 180: 300-308.
287. Ivetic A (2013) Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 550-555.
288. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678-689.
289. McEver RP, Zhu C (2010) Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 363-396.
290. Garbers C, Janner N, Chalaris A, Moss ML, Floss DM, et al. (2011) Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 286: 14804-14811.
291. Surprenant A, North RA (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71: 333-359.
292. Jamieson GP, Snook MB, Thurlow PJ, Wiley JS (1996) Extracellular ATP causes loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *J Cell Physiol* 166: 637-642.

BIBLIOGRAPHIE

293. Gu B, Bendall LJ, Wiley JS (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* 92: 946-951.
294. Le Gall SM, Bohe P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, et al. (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20: 1785-1794.
295. Gifford JL, Ishida H, Vogel HJ (2012) Structural insights into calmodulin-regulated L-selectin ectodomain shedding. *J Biol Chem* 287: 26513-26527.
296. Deng W, Srinivasan S, Zheng X, Putkey JA, Li R (2011) Interaction of calmodulin with L-selectin at the membrane interface: implication on the regulation of L-selectin shedding. *J Mol Biol* 411: 220-233.
297. Deng W, Putkey JA, Li R (2013) Calmodulin adopts an extended conformation when interacting with L-selectin in membranes. *PLoS One* 8: e62861.
298. Darmellah A, Rayah A, Auger R, Cuif MH, Prigent M, et al. (2012) Ezrin/radixin/moesin are required for the purinergic P2X7 receptor (P2X7R)-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 287: 34583-34595.
299. Foster JG, Carter E, Kilty I, MacKenzie AB, Ward SG (2013) Mitochondrial superoxide generation enhances P2X7R-mediated loss of cell surface CD62L on naive human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 190: 1551-1559.
300. Delarasse C, Auger R, Gonnord P, Fontaine B, Kanellopoulos JM (2010) The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*.
301. Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* 180: 7147-7157.
302. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, et al. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176: 3877-3883.
303. Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519-550.
304. Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13: 397-411.
305. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, et al. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276: 125-132.
306. Kahlenberg JM, Dubyak GR (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1100-1108.
307. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, et al. (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15: 825-835.
308. Brough D, Le Feuvre RA, Wheeler RD, Solovyova N, Hilfiker S, et al. (2003) Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages. *J Immunol* 170: 3029-3036.
309. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, et al. (2011) Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 186: 6553-6561.
310. Sluyter R, Stokes L (2011) Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. *Recent Pat DNA Gene Seq* 5: 41-54.
311. Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, et al. (2010) Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* 24: 3393-3404.
312. Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC, Greenfeder S (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 17-27.
313. Feng YH, Li X, Wang L, Zhou L, Gorodeski GI (2006) A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281: 17228-17237.

BIBLIOGRAPHIE

314. Schwarz N, Drouot L, Nicke A, Fliegert R, Boyer O, et al. (2012) Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS One* 7: e41269.
315. Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, et al. (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114: 386-396.
316. Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Miras-Portugal MT (2005) Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS Lett* 579: 3783-3788.
317. Marin-Garcia P, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Leon D, Miras-Portugal MT (2008) Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience* 151: 361-373.
318. Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, et al. (2009) A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* 284: 25813-25822.
319. Masin M, Young C, Lim K, Barnes SJ, Xu XJ, et al. (2012) Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts. *Br J Pharmacol* 165: 978-993.
320. Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, et al. (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18: 595-599.
321. Syberg S, Schwarz P, Petersen S, Steinberg TH, Jensen JE, et al. (2012) Association between P2X7 Receptor Polymorphisms and Bone Status in Mice. *J Osteoporos* 2012: 637986.
322. Caseley EA, Muench SP, Roger S, Mao HJ, Baldwin SA, et al. (2014) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. *Int J Mol Sci* 15: 13344-13371.
323. Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, et al. (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels* 5: 347-354.
324. Saul A, Hausmann R, Kless A, Nicke A (2013) Heteromeric assembly of P2X subunits. *Front Cell Neurosci* 7: 250.
325. Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, et al. (2011) P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br J Pharmacol* 163: 1069-1077.
326. Kawano A, Tsukimoto M, Noguchi T, Hotta N, Harada H, et al. (2012) Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 374-380.
327. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358-404.
328. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, et al. (2012) Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 3: 1034.
329. Bordon Y (2014) Innate immunity: skin fibroblasts shield mast cells. *Nat Rev Immunol* 14: 286.
330. Humphreys BD, Dubyak GR (1996) 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. *J Immunol* 157: 5627-5637.
331. Martel-Gallegos G, Rosales-Saavedra MT, Reyes JP, Casas-Pruneda G, Toro-Castillo C, et al. (2010) Human neutrophils do not express purinergic P2X7 receptors. *Purinergic Signal* 6: 297-306.
332. Coutinho-Silva R, Ojcius DM (2012) Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* 14: 1271-1277.

BIBLIOGRAPHIE

333. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Rodrigues JC, Corte-Real S, Coutinho-Silva R, et al. (2011) Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 6: e25356.
334. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, et al. (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24: 1-7.
335. Di Virgilio F (2005) Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 1: 205-209.
336. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, et al. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267: 2000-2003.
337. Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, et al. (2010) Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16: 1434-1438.
338. Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, et al. (2002) A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 359: 1114-1119.
339. Sakowicz-Burkiewicz M, Kocbuch K, Grden M, Maciejewska I, Szutowicz A, et al. (2013) High glucose concentration impairs ATP outflow and immunoglobulin production by human peripheral B lymphocytes: involvement of P2X7 receptor. *Immunobiology* 218: 591-601.
340. Gonzalez-Amaro R, Cortes JR, Sanchez-Madrid F, Martin P (2013) Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med* 19: 625-632.
341. Antas PR, Oliveira EB, Milagres AS, Franken KC, Ottenhoff TH, et al. (2002) Kinetics of T cell-activation molecules in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1097-1099.
342. Sancho D (2005) CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology* 26: 136-140.
343. Shiow LR (2006) CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*.
344. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21: 107-137.
345. Klaus SJ, Sidorenko SP, Clark EA (1996) CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol* 156: 2743-2753.
346. Bleesing JJ, Morrow MR, Uzel G, Fleisher TA (2001) Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* 213: 72-81.
347. Renno T, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR (1996) Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* 183: 431-437.
348. Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, et al. (1998) Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* 28: 540-547.
349. Bobe P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MK (2006) Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* 108: 3967-3975.
350. Prochazka L, Tesarik R, Turanek J (2014) Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal* 26: 2234-2239.
351. Mitchell DM (2010) An Activation Marker Finds a Function. *Immunity* 32.
352. Baaten BJJ (2009) CD44 Regulates Survival and Memory Development in Th1 Cells. *Immunity*.
353. Lin C, Ren S, Zhang L, Jin H, Sun J, et al. (2012) Extracellular ATP induces CD44 shedding from macrophage-like P388D1 cells via the P2X7 receptor. *Hematol Oncol* 30: 70-75.
354. Garton KJ, Gough PJ, Raines EW (2006) Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 79: 1105-1116.

BIBLIOGRAPHIE

355. Frascoli M, Marcandalli J, Schenk U, Grassi F (2012) Purinergic P2X7 receptor drives T cell lineage choice and shapes peripheral gammadelta cells. *J Immunol* 189: 174-180.
356. Schenk U, Frascoli M, Proietti M, Geffers R, Traggiai E, et al. (2011) ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* 4: ra12.
357. Chused TM, Apasov S, Sitkovsky M (1996) Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation. *J Immunol* 157: 1371-1380.
358. Sharp AJ, Polak PE, Simonini V, Lin SX, Richardson JC, et al. (2008) P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 5: 33.
359. Chen L, Brosnan CF (2006) Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* 176: 3115-3126.
360. Lutz SE, Gonzalez-Fernandez E, Ventura JC, Perez-Samartin A, Tarassishin L, et al. (2013) Contribution of pannexin1 to experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 8: e66657.
361. Zhao J, Wang H, Dai C, Zhang H, Huang Y, et al. (2013) P2X7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/caspase 1 pathway. *Arthritis Rheum* 65: 3176-3185.
362. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, et al. (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168: 6436-6445.
363. North RA, Jarvis MF (2013) P2X receptors as drug targets. *Mol Pharmacol* 83: 759-769.
364. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, et al. (2008) ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 455: 808-812.
365. Neves AR, Castelo-Branco MT, Figliuolo VR, Bernardazzi C, Buongusto F, et al. (2014) Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 444-457.
366. Chen GM, Feng CC, Ye QL, Tao JH, Li R, et al. (2013) Association of P2X7R gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Mutagenesis* 28: 351-355.
367. Le Gall SM, Legrand J, Benbijja M, Safya H, Benihoud K, et al. (2012) Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220⁺ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* 7: e52161.
368. Hwang SM, Li J, Koo NY, Choi SY, Lee SJ, et al. (2009) Role of purinergic receptor in alpha fodrin degradation in Par C5 cells. *J Dent Res* 88: 927-932.
369. Pradhan D, Morrow J (2002) The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production. *Immunity* 17: 303-315.
370. Pang M, He J, Johnson P, Baum LG (2009) CD45-mediated fodrin cleavage during galectin-1 T cell death promotes phagocytic clearance of dying cells. *J Immunol* 182: 7001-7008.