



**HAL**  
open science

# Caractérisation et régulation des lymphocytes T CD4+CD73+ en contextes physiologique et pathologique

Marion Bossennec

► **To cite this version:**

Marion Bossennec. Caractérisation et régulation des lymphocytes T CD4+CD73+ en contextes physiologique et pathologique. Immunologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1159 . tel-02876542

**HAL Id: tel-02876542**

**<https://theses.hal.science/tel-02876542>**

Submitted on 21 Jun 2020

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

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



N°d'ordre NNT : 2018LYSE159

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**(BMIC Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)**

**Spécialité de doctorat** : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
**Discipline** : Immunologie

Soutenue publiquement le 19/09/2018, par :  
**Marion Sophie BOSSENEC**

---

**Caractérisation et régulation des  
lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> en contextes  
physiologique et pathologique**

---

Devant le jury composé de :

**NICOLAS Jean-François**

**LOUIS-PLENCE Pascale**

**BORG Christophe**

**DARDAHLON Valérie**

**ROMERO Pedro**

**MENETRIER-CAUX Christine**

PUPH, HCL-Lyon Sud

CR1 INSERM, IRMB Montpellier

PUPH, CHU Besançon

CR1 CNRS, IGMM Montpellier

Médecin Chercheur, UNIL Lausanne

Cadre Biologiste 3, CLB Lyon

**Président du jury**

**Rapporteure**

**Rapporteur**

**Examinatrice**

**Examineur**

**Directrice de thèse**



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G. RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement le Dr Pascale Louis-Plence et le Pr Christophe Borg d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Dr Valérie Dardalhon et le Pr Pedro Romero d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineurs et le Dr Jean-François Nicolas de le présider. Je remercie aussi les Dr Julien Marie, Natacha Bessis et Valérie Dardalhon pour leurs précieux conseils lors de mes comités de suivi de thèse durant ces trois dernières années. Je remercie aussi le Dr Fabienne Coury et le Pr Hubert Marotte pour leur collaboration et conseils avisés sur le projet auto-immunité. Je remercie également le Dr Mathilde Couturier pour le temps et les prélèvements qu'elle a pu consacrer à mon projet. Je remercie également les partenaires du consortium européen TumAdoR, en particulier Selena Vigano, Ines Monteiro pour les échanges que nous avons pu avoir lors des réunions du projet et qui m'ont permis d'avancer sur différents points de mon projet et de découvrir de nouveaux outils d'analyse.

Mon intérêt pour l'équipe et ses thématiques de recherche remonte à plusieurs années et je te remercie, Christophe, d'avoir accepté de m'accueillir dans l'équipe comme étudiante en M2 avant de me laisser poursuivre dans l'aventure de la thèse. Ces quatre années à ton contact ont été très enrichissantes et je garderai longtemps le souvenir de ton implication sans limite dans tous les projets avec comme seul intérêt de faire avancer la science. Cela restera pour moi un exemple à suivre, souvent imité jamais égalé, mais je ferai en sorte de veiller à l'entretenir, quel que soit le chemin que j'emprunte par la suite. Christine, tout ce travail n'aurait pas non plus été possible sans ton implication et ta disponibilité constantes. Tu m'as laissée une grande autonomie dans ma démarche et la mise en place de mes idées tout au long de cette thèse et je t'en suis reconnaissante. Je suis arrivée en thèse comme ta première étudiante fille, j'en repartirai comme le « petit pimousse stakhanoviste ». Que de chemin parcouru... J'espère ne pas avoir trop bousculé les codes avec mes critères de rédaction (non, je ne me fais toujours pas aux « i »). Maintenant que je suis sur le départ tu vas pouvoir les réutiliser.

J'ai eu la chance d'évoluer dans un environnement scientifique et humain incroyable pendant ces quatre années et il y a beaucoup de personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce que ce travail arrive à terme.

Nico, tu m'as transmis les rênes du projet et m'as beaucoup appris, non seulement en terme de techniques mais également de raisonnement scientifique et ton investissement sans borne dans le projet m'a impressionnée. Je suis contente d'avoir pu garder contact avec toi au-delà des murs du centre pour te poser mes éternelles questions de protocole (je n'ai jamais réussi à trouver les infos que je cherchais dans tes cahiers de labo, vas comprendre...) ou bien pour profiter d'un week-end sous le soleil marseillais ou ailleurs. Merci à toi également Céline pour

ton aide et tes conseils sur les manips. La malédiction des dosages nous aura poursuivi jusqu'au bout mais finalement on aura réussi à la surmonter à chaque fois ☺. Je garde également en tête nos échanges de bons plans pour nos destinations de vacances qui vont me manquer. Merci à toi aussi Franceline. J'ai passé de supers moments à travailler à tes côtés au début de ma thèse. Ta bonne humeur communicative restera longtemps comme une référence au labo. A présent je passe le flambeau à Anthony : à toi de faire fructifier la suite de ce projet qui s'annonce palpitant !

Lorsque l'on passe plusieurs années dans un environnement professionnel et que l'on partage les mêmes petites victoires et les mêmes galères que ses collègues, cela crée forcément des liens. J'ai eu beaucoup de chance d'être entourée de personnes altruistes et attentionnées qui ont rendu le quotidien de doctorante agréable. A commencer par toi, mon fil/ananas. Nos séances en pièce culture avec Offenbach en fond (à fond ?), nos brunchs dominicaux du samedi agrémentés d'une session yoga et/ou culture cell' en fonction des impératifs du moment, ou encore nos sorties sponsorisées par Anayelp. Faire cette thèse avec toi à mes côtés a été un privilège. Même si je ne serai bientôt plus en culture avec ma blouse trop grande pour faire le clown je compte sur toi pour ne rien lâcher et j'attends avec impatience de fêter ton travail et ton incroyable ténacité. Merci aussi à vous Susu et Mc Dile. Vous avez été des soutiens importants tout au long de cette thèse, même récemment alors que vous avez rejoint d'autres horizons professionnels et que les jours qui s'annonçaient n'étaient pas les plus fun. Nos petits pique-niques et nos discussions passionnées auront décidément marqué mes années ici. J'espère aussi avoir été une « pet-sitter » à la hauteur pour tous vos petits amis à quatre pattes ☺ Merci également à toi Margaux pour ce que l'on a partagé au labo et en dehors. Je n'aurais pas pu imaginer meilleure voisine de bureau. Merci aussi pour tes nombreuses pâtisseries aussi belles que bonnes qui ont adouci de longues journées de manip, et pour ton incroyable granola (sans cannelle) qui avait le pouvoir de me faire oublier les sessions de facs à rallonge qui m'attendaient une fois arrivée au labo. Et je m'incline évidemment devant ta performance inégalée sur « confessions nocturnes » avec Mc Dile, rdv le 20 décembre pour une petite rediffusion ;) Coline, merci pour ta gentillesse, ton altruisme et pour ces moments de détente salvateurs autour d'un jeu et/ou de sushis. Je te souhaite bon courage dans cette dernière ligne droite. De beaux projets t'attendent pour la suite, le plus dur sera encore de choisir ☺ Julie : toujours enjouée, on te connaît surtout pour ton incroyable dévouement dans la vie du labo mais j'ai aussi pu découvrir une personne fondamentalement gentille et farceuse ;) je te souhaite le meilleur pour la suite, que ce soit en chef d'entreprise ou en pro de la vulgarisation scientifique (les deux ne sont peut-être pas incompatibles). Merci également à toi, Pacôme, pour ta gentillesse et ta ponctualité en soirée. Ah non pardon ! Je retiendrai par contre tes talents d'acteur dans nos réalisations cinéma-caux-graphiques, officielles ou non...

Merci aussi pour ces longues conversations scientifiques à des heures indues où l'on refaisait le monde (de l'immunologie). Merci à toi aussi Paola, d'avoir apporté une touche internationale à l'équipe et d'être toujours partante pour partager avec nous tes connaissances en auto-immunité ou en tiramisu.

Merci aussi à vous Hélène et Emmanuelle. Vous êtes passées par la labo pour vos années de M2 recherche et j'ai adoré partager avec vous une discussion autour d'un thé et découvrir le pan médical de l'oncologie. Akira thank you also for the good times back when you were with us in the lab !

J'ai également eu la chance de côtoyer des doctorants qui sont devenus docteurs alors que je n'étais encore qu'en M2 ou que je débutais ma thèse. Ils ont été un exemple et m'ont fourni de précieux conseils notamment dans la gestion de la dernière phase, et pas des moindres, de cette thèse à savoir la rédaction. Amélien, je ne saurais pas dire quand exactement nous avons commencé à partager plus qu'un bout de paillasse ou un repas au self mais ce qui est sûr c'est que j'ai pris avec toi certains des fou-rire les plus monumentaux de ma thèse. Tu es quelqu'un de très attentionné quoique pas toujours gentil (j'étais obligée). Je m'incline évidemment devant tes talents de Schumarer, de Cousteau, et de Pinturault (même quand tu rates la sortie de piste pour le télécabine...) sans oublier ton évidente parenté à Eddy Mitchell. Merci pour tout, vraiment. Elena, il y a un an tu étais à ma place et je me demandais comment tu gérais cette période avec autant de discipline. Aujourd'hui j'en ai une petite idée. Merci pour tes conseils et pour le franc parler qui te caractérise et qui a marqué les années que nous avons partagées au laboratoire. Merci aussi à toi Rodrigo, j'ai eu la chance de te côtoyer au début de ma thèse et d'apprendre beaucoup de choses à ton contact. Je te souhaite plein de belles aventures pour cette nouvelle vie parisienne à trois ☺ Merci également à toi, François, pour tes airs d'opéra en pièce d'extraction, ton affection sans borne pour les chansons de Christine (and the Queens, je précise) et ton amour des bonnes pâtisseries, agrémentées d'une petite anecdote historique lorsque cela pouvait s'y prêter. Nelly tu as été la première doctorante que j'ai vu soutenir et je me souviens de nos conversations pleines de conseils pour la suite de mon travail. Pour tous ces moments de partage merci encore.

Merci à vous Elise, Baptiste, Marie et Clément. Je ne vous ai pas côtoyé très longtemps au centre mais vous avez toujours été disponibles et enjoués pour tous les projets, scientifiques ou non, dans lesquels j'ai pu être impliquée à vos côtés et votre bonne humeur constante était très agréable.

Venons-en aux sages (quoique pas toujours !) du labo, aux piliers des sous-groupes, j'ai nommé les PI. A commencer par la voisine de bureau de ma chef, qui a enduré à plusieurs reprises nos conversations sur CD73 alors qu'elle n'a d'yeux que pour les NK et les pDC. J'ai pourtant essayé de te soudoyer avec du chocolat Nath mais rien n'y a fait, c'est dire ! Merci aussi à toi Jenny,



pour ton grand cœur qui nous a amenés à faire l'expérience d'un refuge SPA l'espace d'une journée, pour nos craquages open spaciens que tu tolérais de bonne grâce (quand tu ne les alimentais pas :P ). Marie, merci pour ta disponibilité et ton accessibilité. C'était toujours agréable d'entamer des conversations avec toi sur des sujets divers et variés jusqu'à une heure parfois avancée. Tu as également apporté une touche girly étincelante au labo avec tes décors de Noël et l'aménagement impeccable de ton bureau ☺, bureau partagé avec Bertrand que je remercie pour ses nombreux conseils lors des réunions que j'ai pu faire devant l'équipe. Isa, j'espère que cela n'a pas été trop dur de nous supporter comme voisines avec Margaux, tu es sûrement la personne de l'Open Space qui connaît le mieux nos cachettes sucrées en cas de coup dur. Merci pour ta discrétion qui nous a permis de garder ce secret jusqu'à maintenant ;)

Tous les projets que nous entreprenons au laboratoire ne pourraient pas être menés à bien sans l'investissement des ingés et techniciennes qui partagent notre quotidien. Merci donc aux occupantes du bocal, Dom et Anne-Claire. Pour tout ce que vous faites pour la vie du labo, tant de petits gestes que nous ne voyons pas forcément mais qui font que l'on peut lancer simultanément 3 Ficoll, une digestion enzymatique de tumeur et faire des cultures en plaques fond U, V ou W sans venir à manquer ☺ Merci à toi également Lyvia, pour tes connaissances en biomol et ton aide précieuse dans le domaine, tes chansons calientes qui résonnaient en culture, ton amour inconditionnel et communicatif du chocolat (sans noisettes). Merci à toi aussi Pauline, pour ces sessions Flow Jo que tu as rendues animées avec tes analyses hybrides ;) Merci à vous enfin Justine et Fanny, les deux dernières venues de cette équipe de choc. Si on a besoin d'apprendre à parler IF et IHC, c'est définitivement vers vous qu'il faut désormais se tourner.

Merci à vous aussi les filles de P3I ! Estelle, ton titre de prêtresse de la cytométrie demeure et je te remercie pour tous les conseils que tu as pu me donner dans ce domaine. Charlotte, Axelle merci pour votre gentillesse à chaque fois que j'ai eu à venir vous voir pour une question, un conseil ou lorsque nous avons (un peu) encombré votre espace de manip alors que notre labo était en chantier de réhabilitation... Merci également à l'équipe d'anatomopathologie et particulièrement Sophie et Séverine pour tout le travail que vous fournissez afin que nous ayons accès à des prélèvements pour nos projets.

Je souhaite également bonne chance et bon courage aux étudiants actuels, Marie, Benoît, Vincent, Olivia, Arthur, Julie et Nabil dans leurs projets futurs de médecins, doctorants (de France ou d'Angleterre), bioinfo... J'ai hâte de voir les étincelles que vous produirez ☺

J'ai également réussi à retrouver une personne très spéciale au tout premier jour de son contrat de doctorante. Belle surprise de te voir à ce premier séminaire de département Alex. Depuis nous avons eu l'occasion d'en faire quelques-uns supplémentaires, ainsi que des soirées dont

le thème mettait à l'honneur lactobacillus et les levures oenologiques. Partenaires de concert (groupies ?) de choc, je crois que nous avons à nous deux assez bien vérifié le proverbe qui affirme que la musique adoucit l'esprit. Grazie anche a te Giacomo ! J'ai beaucoup aimé partager cette expérience de la thèse avec toi et pouvoir échanger sur des sujets variés. Ah et quand tu veux pour un footing (non, avant un aperitivo :p ).

Merci aussi à toi Mathilde. On a traversé pas mal d'étapes ensemble depuis la L3. Le master 1 avec notre épopée américaine, une vidéo de fin de master mythique (Perrine Montfort et Thibault Roland peuvent en attester), le tout ponctué de shows en rouge et noir endiablés. On a ensuite vécu cette folle aventure de la thèse en même temps et on s'est soutenues au fil des épreuves qui l'ont jalonnée. Si j'ai retenu une chose de cette période, maintenant bien révolue, c'est qu'il n'est rien qu'un bon brunch ne puisse aider à surmonter ☺. Je te souhaite de t'épanouir pleinement en tant que prof, je sais que tu y trouveras ce que tu recherches. Merci à toi aussi Manue, 3<sup>e</sup> élément de ce trio de folie. Malgré la distance tu es toujours restée disponible et tu as su trouver les mots pour nous remotiver toutes les deux. Merci pour ces petits week-end aux quatre coins de la France qui nous permettaient de recharger les batteries avant de repartir de plus belle.

Merci à la team ENS : Pépito, Perrine, Suzanne, Tim, Antoine, Vincent, Thibault, Adrien, Victor, Dodo, Marie, Dadou, Martin, Lucas, Céline. Ceux qui sont restés lyonnais, ceux qui sont (re)devenus parisiens voire même tourangeaux mais qui répondent toujours présents.

Un immense merci à vous tous les boute-en-train du TDV : Solène, Antoine, Agathe, Marie B, Quentin, Marjo, Astrid, Marie I, Ariane, Mathilde, Alice, Alexis. Les chansons des danses ont accompagné pas mal de mes manips, sûrement celles qui ont donné des résultats d'ailleurs ;) la thèse reste quand même moins fun que la colo. Pas sûr que j'ai plus dormi pendant ma thèse que pendant les semaines de direction. Ce qui est certain en revanche c'est que j'ai consommé moins de glaces en trois ans de thèse qu'en trois séjours auvergnats à vos côtés ;)

Merci aussi à vous, mes mousquetaires parisiennes : Elise, Céline et Nanou. On en a traversé des épreuves depuis la prépa et cette thèse n'était qu'une étape de plus (peut-être moins dure que le semi à venir tout bien réfléchi...). Merci pour vos messages décalés et vos blagues débiles qui sont toujours tombés à pic. Marie, merci pour tout. Tu as toujours été là dans les bons moments comme dans les plus durs. J'espère être encore longtemps dans le coin pour que l'on fasse encore un bout de chemin ensemble. Merci aussi à toi Clémence pour tes nombreux conseils pour la suite, et à toi Pauline pour tes petits messages dès que tu avais un moment,

même une fois devenue maman. Tout comme Marie vous êtes là depuis le début et je suis heureuse de pouvoir partager cet aboutissement avec vous.

Un énorme merci aussi à ma famille qui a été la clé de mes réussites jusqu'ici et particulièrement de celle-là. Je tiens à remercier mes parents et Cléclé. Je ne pense pas avoir été plus insupportable que d'habitude pendant cette thèse (juste tout autant) mais ce qui est sûr c'est que je n'y serais pas arrivée sans vous à bien des égards. Je pense aussi à mes grands-mères avec qui je me suis entraînée à vulgariser mon sujet de recherche un certain nombre de fois (interro surprise bientôt).

Enfin merci à toi Grégoire. Tu es sûrement la plus belle découverte de cette thèse en définitive.

**« Happiness can be found even in the darkest of times, if one  
only remembers to turn on the light »**

Albus Dumbledore

A Clémence, Louis et Michel



# TABLE DES MATIERES

---

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>17</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>I. Biologie des lymphocytes T dans le système immunitaire adaptatif .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et établissement d'une mémoire immunitaire .....</b>	<b>20</b>
a. Activation des lymphocytes naïfs par présentation d'Ag .....	20
b. Différenciation des lymphocytes T .....	21
<b>2. Focus sur la réponse T CD4<sup>+</sup> : les différentes sous-populations de T effecteurs mémoires helper.....</b>	<b>23</b>
a. Les Th1 sont impliqués dans la réponse à des agents infectieux viraux et bactériens et jouent un rôle central dans l'immunité anti-tumorale .....	24
b. Les Th2 sont impliqués dans la réponse antiparasitaire ainsi que dans l'orchestration de la réponse allergique.....	25
c. Les Th17 : un lignage Th qui refonde la conception de la différenciation T helper .....	27
Découverte et caractérisation des Th17 .....	27
La question de la différenciation Th17 chez l'Homme.....	28
Implication des Th17 dans la résolution des infections et dans les pathologies auto-immunes ....	29
d. Les Th1.17 ou Th17 pathogéniques : une population hétérogène polyfonctionnelle .....	30
e. Les Th22 : impliqués dans l'immunité des muqueuses.....	34
f. Les Th9 : des fonctions inflammatoires pléiotropes.....	35
<b>3. Régulation de la réponse T.....</b>	<b>38</b>
a. Les T régulateurs (Treg).....	38
b. Les mécanismes d'immuno-régulation des Treg .....	39
<b>II. L'axe CD39/CD73 dans l'immuno-régulation chez l'Homme.....</b>	<b>42</b>
<b>1. L'ATP extracellulaire : origine et fonctions dans le système immunitaire .....</b>	<b>43</b>
a. Origine de l'ATP extracellulaire.....	43
b. Les récepteurs de l'ATP et fonctions .....	43

i.	Action sur les cellules myéloïdes .....	44
ii.	Action sur les cellules lymphoïdes.....	45
<b>2.</b>	<b>L'Ado extracellulaire : origine et fonctions immunes .....</b>	<b>46</b>
a.	Origine de l'Ado extracellulaire .....	46
b.	Récepteurs spécifiques de l'Ado extracellulaire.....	47
i.	Action sur les cellules myéloïdes .....	49
o	CPAg.....	49
o	Macrophages .....	50
o	Neutrophiles .....	50
ii.	Action sur les cellules lymphoïdes.....	51
o	Lymphocytes T .....	51
o	Autres cellules lymphoïdes .....	52
<b>3.</b>	<b>Les ecto-nucléotidases CD39 et CD73, des « interrupteurs moléculaires » impliqués dans la régulation de l'inflammation .....</b>	<b>53</b>
a.	Organisation moléculaire.....	54
b.	Expression sur les cellules du système immunitaire .....	56
i.	Les cellules myéloïdes .....	56
o	Macrophages et monocytes .....	56
o	Neutrophiles .....	57
o	Cellules dendritiques.....	57
ii.	Les cellules lymphoïdes.....	58
o	Lymphocytes B .....	58
o	Cellules NK .....	58
o	Lymphocytes T CD8+ .....	59
o	Lymphocytes T CD4+ .....	60
c.	Expression des ecto-enzymes et des AdoR sur les cellules tumorales et impact fonctionnel sur le développement tumoral .....	62
<b>4.</b>	<b>Régulation de l'expression des ecto-enzymes sur les cellules immunes.....</b>	<b>64</b>
a.	Régulation de CD39.....	64
b.	Régulation de CD73.....	65
<b>III.</b>	<b>Inflammation médiée par les lymphocytes T dans la PR et le RPso .....</b>	<b>68</b>
<b>1.</b>	<b>La PR : étiologie, physiopathologie et traitement .....</b>	<b>68</b>
a.	Etiologie .....	68
b.	Physiopathologie .....	69
•	L'IL-17A, les Th17 et les Th1.17 dans la PR .....	71
c.	Diagnostic et traitements de la PR .....	72

<b>2. Le RPso : étiologie, physiopathologie et traitement .....</b>	<b>74</b>
a. Etiologie .....	74
b. Physiopathologie .....	76
• L'IL-17A, les Th17 et les Th1.17 dans le RPso .....	78
c. Diagnostic et traitements du RPso .....	79
<b>3. Rôle de l'axe adénoenergique dans la PR et le RPso .....</b>	<b>80</b>
<b>IV. Expression de MDR1 par les lymphocytes T : revue .....</b>	<b>82</b>
 <b>RESULTATS .....</b>	 <b>99</b>
<b>I. Caractérisation de la population de Teff exprimant CD73 chez l'Homme en contexte physiologique et chez des patientes atteintes de cancer du sein ou de l'ovaire .....</b>	<b>99</b>
<b>II. Etude des sous populations Th exprimant CD73 avant et sous traitement par Méthotrexate chez des patients atteints de PR ou de RPso .....</b>	<b>123</b>
<b>III. La population de Teff CD73<sup>+</sup> présente une capacité accrue de résistance aux chimiothérapies substrats de MDR1.....</b>	<b>153</b>
<b>IV. Résultats supplémentaires : Régulation de CD73 dans les cellules immunes chez l'Homme .....</b>	<b>179</b>
 <b>DISCUSSION.....</b>	 <b>195</b>
Importance relative de la production d'Ado par les Teff CD73 <sup>+</sup> en contexte tumoral.....	196
Quel mécanisme est responsable de l'arrêt dans le cycle cellulaire constaté sur des Teff CD73 <sup>+</sup> en condition de prolifération ? .....	198
L'expression de CD73 sur les LT chez l'Homme semble s'inscrire dans un patron transcriptionnel et fonctionnel qui dépasse le paradigme CD4/CD8 .....	199
L'expression de MDR1 par les Th1.17 CD73 <sup>+</sup> , un mécanisme physiologique de tolérance dans l'intestin ? .....	202
Quel(s) facteur(s) influence(nt) la différenciation de la population effectrice CD4 <sup>+</sup> exprimant CD73 ? .....	203
La restauration de l'expression de CD73 sur les Teff dans les maladies auto-immunes : un moyen d'enrayer l'inflammation chronique ?.....	207



Vers des combinaisons thérapeutiques visant à augmenter la fonction enzymatique de CD73 dans les pathologies auto-immunes ? .....209

L'expression de MDR1 par les Teff CD73+ pourrait présenter un avantage sélectif en contexte tumoral .....211

**CONCLUSION GENERALE ..... 215**

**REFERENCES ..... 217**

## ABREVIATIONS

---

Ac : Anticorps

ACPA : Anti-citrullinated protein antibody = anticorps anti-protéine citrullinée

ADA : Adénosine déaminase

Ado/AMP/ATP : Adénosine/ Adénosine-monophosphate/ Adénosine-triphosphate

AMPc : AMP cyclique

AMPDA : AMP déaminase

AdoR : Adenosine receptor = récepteur de l'adénosine

Ag : Antigène

AIC : Arthrite induite au collagène

AIJ : Arthrite idiopathique juvénile

BCR : B cell receptor= récepteur du lymphocyte B

Breg : lymphocyte B régulateur

Casp1 : Caspase 1

CCR : CC chimiokine receptor : récepteur CC de chimiokine

CM : Central memory = mémoire centrale

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNT : Concentrative nucleotide transporter = transporteur concentratif de nucléotides

CPAg : Cellule présentatrice d'antigènes

CREB : cAMP response element binding protein= protéine se liant aux motifs de réponse à l'AMPc

CRP : C-reactive protein = protéine C réactive

CTL : Cytotoxique T Lymphocyte = lymphocyte T cytotoxique

CXCR : CXC chemokine receptor = récepteur CXC de chemokine

DC : Cellule dendritique

DHFR : Dihydrofolate reductase

DMARDs : Disease modifying anti-rheumatic drugs = agents antirhumatismaux modifiant l'évolution de la maladie

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EM : Effector memory = mémoire effectrice

ENT : Equilibrative nucleotide transporter = transporteur équilibreur de nucléotides

ER : Récepteur aux œstrogènes

FoxP3 : Forkhead Box P3

FR : Facteur rhumatoïde

GC : Glucocorticoïdes

GM-CSF : Granulocyte monocyte colony-stimulating factor = facteur stimulant la formation de colonies monocytaires et granulocytaires

GPCR : G-protein coupled receptor = récepteur couplé à une protéine G

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GzB : Granzyme B

HBV : Hepatitis B virus = virus de l'hépatite B

HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  = facteur 1 $\alpha$  inductible par l'hypoxie

HIV : Human immunodeficiency virus = virus de l'immunodéficience humaine

HLA : Human leukocyte antigen = antigène des leucocytes humains

ICOS : Inducible T cell costimulator

ICP : Immune-checkpoint = point de contrôle immunitaire

IDO : Indoleamine-2,3-dioxygenase

IFN : Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL : Interleukine

KO : Knocked-out = invalidation génique

LAG-3 : Lymphocyte associated gene-3

LS : Liquide synovial

LT : Lymphocyte T

LTBP : Latent TGF- $\beta$  binding protein = protéine associée à la forme latente de TGF- $\beta$

LTCD4/LTCD8 : Lymphocyte T CD4/CD8

MALT : Mucosa associated lymphoid tissue = tissu lymphoïde associé aux muqueuses

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor = facteur stimulant la formation de colonies de macrophages

mDC : DC myéloïde

MDR1 : Multi-drug resistance 1 = transporteur de résistance multi-drogues 1

MDSC : Myeloid-derived suppressive cell = Cellule myéloïde suppressive

M $\phi$  : Macrophage

MMP : Matrix metalloproteinase = métalloprotéine de la matrice

MoDC : Monocyte derived DC = DC dérivée de monocyte

MTX : Méthotrexate

NK : Cellule Natural Killer

OLS : Organe lymphoïde secondaire

PD-1 : Programmed cell-death 1

pDC: DC plasmacytoïde

PGD: Prostaglandines

PgR : Récepteur de la progestérone

PI3K : Phosphatidyl-inositol 3 kinase

PLC : Phospholipase C

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

Pso : Psoriasis

RORC : RAR related orphan receptor C = Récepteur orphelin C relié associé au récepteur de l'acide rétinoïque

ROS : Reactive oxygen species = espèces réactives de l'oxygène

Rpso : Rhumatisme psoriasique

SEP : Sclérose en plaques

TA : Tumor-associated = associé aux tumeurs

TAM : Tumor-associated macrophage = Macrophage associés aux tumeurs

T-bet : T-box expressed in T cells = Box T exprimée dans les lymphocytes T

TCR : T cells receptor= récepteur du lymphocyte T

Teff : Lymphocyte CD4<sup>+</sup> T effecteur

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$

Th : Lymphocyte T helper

TIM-3 : T cells Ig and mucin domain containing molecule -3

TIGIT : T cells Ig and ITIM domain

TLR : Toll-like receptor = récepteur Toll-like

TNBT : Triple negative breast tumor = tumeur du sein triple négative

TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : Lymphocyte T régulateur

# **PREAMBULE**

---

A l'heure du développement exponentiel des stratégies thérapeutiques s'appuyant sur des connaissances détaillées du fonctionnement du système immunitaire, l'étude des populations de lymphocytes T mémoires constitue un enjeu majeur de par leur rôle central pour une réponse immunitaire adaptative efficace. Les travaux qui suivent proposent une caractérisation approfondie de la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs (Teff) exprimant l'ecto-nucléotidase CD73 chez l'Homme et de sa régulation en contextes physiologique et pathologique. Afin de replacer ces travaux dans la littérature actuelle, un état de l'art de la diversité des populations de lymphocytes T mémoires connues à ce jour est proposé avec un intérêt particulier pour les profils de lymphocytes T helper pro-inflammatoires Th17 et Th1.17. L'axe de dégradation de l'ATP extracellulaire en adénosine immunosuppresseur, reposant sur les ecto-nucléotidases CD39 et CD73, est ensuite détaillé. Une brève présentation des pathologies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde et rhumatisme psoriasique), objets de l'un de mes axes de recherche, est ensuite proposée. Elle inclut notamment les données disponibles concernant le rôle de l'axe adénosinergique dans ces pathologies. Enfin une revue de la littérature sur l'expression du transporteur MDR1 dans les cellules immunes et ses conséquences en contexte pathologique me permet d'introduire le travail mené sur l'expression de MDR1 par les lymphocytes T, en particulier les Teff CD73<sup>+</sup>, et ses implications fonctionnelles en contexte tumoral.

# **INTRODUCTION**

---

## **I. BIOLOGIE DES LYMPHOCYTES T DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF**

La réponse immunitaire fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires et repose sur des interactions complexes. Afin de faciliter la compréhension de son fonctionnement, on distingue classiquement deux grands ensembles complémentaires: la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée fait intervenir des cellules reconnaissant des signaux de danger variés peu spécifiques (neutrophiles, cellules Natural Killer (NK), monocytes,

macrophages ( $M\phi$ ), cellules dendritiques (DC)) qui ont toutes en commun la capacité à être recrutées rapidement au lieu de l'infection et qui agissent *via* des mécanismes génériques d'induction de l'inflammation et d'élimination des pathogènes ou des cellules infectées. La réponse immunitaire adaptative en revanche est mise en place secondairement, après la détection d'une infection ou d'une anomalie cellulaire non-infectieuse (tumeur). Elle est caractérisée par l'émergence de cellules immunitaires très spécifiques. Leur spécificité repose sur des récepteurs uniques résultant d'une recombinaison génétique. Ces cellules sont dites mémoires car elles peuvent persister dans l'organisme et être remobilisées en cas d'apparition récurrente de l'antigène (Ag). La réponse immunitaire adaptative repose sur deux grandes classes de cellules : les lymphocytes B, acteurs centraux de la réponse immunitaire humorale, et les lymphocytes T, cellules majeures de la réponse immunitaire cellulaire. C'est sur cette dernière classe de lymphocytes et les multiples fonctions qui lui sont associées que je m'attarde dans la première partie de mon introduction.

## **1. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> ET CD8<sup>+</sup> ET ETABLISSEMENT D'UNE MEMOIRE IMMUNITAIRE**

### **a. Activation des lymphocytes naïfs par présentation d'Ag**

On distingue les lymphocytes T naïfs, n'ayant jamais été exposés à un Ag, des lymphocytes T mémoires, clonaux, qui reconnaissent leur Ag plus rapidement et ont un phénotype pré-activé. Le passage d'un état naïf à un état mémoire fait intervenir une multitude de signaux cellulaires médiés par des récepteurs spécifiques. Tous les lymphocytes T ont un récepteur commun qui présente une spécificité antigénique appelé le T cell receptor (TCR). Il est composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  et, associé avec deux chaînes hétéro-dimériques CD3 et deux chaînes  $\zeta$ , il forme le complexe TCR. Ce complexe est capable de reconnaître un Ag apprêté sous forme de peptide sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentée par les cellules présentatrices d'Ag (CPAg : majoritairement les DC mais aussi les lymphocytes B activés, les monocytes et les  $M\phi$ ) (H Clevers et al., 1988). On distingue deux grands types de lymphocytes T selon les molécules de CMH qu'ils sont capables de reconnaître grâce à leurs chaînes accessoires (Barber et al., 1989).

D'une part les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (LTCD8) sont capables de reconnaître un peptide présenté sur des molécules de CMH de classe I grâce à la chaîne CD8. Le CMH I est exprimé de manière ubiquitaire par les cellules de l'organisme et présente des peptides du « Soi » en contexte d'homéostasie (signal « don't kill me » pour les cellules de l'immunité innée) mais expose des peptides du « non-Soi » ou du « Soi altéré » sur des cellules infectées ou anormales permettant leur reconnaissance et leur élimination par les LTCD8 mémoires.

D'autre part, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LTCD4) expriment la chaîne accessoire CD4 qui leur permet de reconnaître un peptide antigénique présenté sur des molécules de CMH de classe II (Nag et al., 1993). Le CMH de classe II n'est exprimé que par les CPAg, dont le rôle principal est l'éducation des lymphocytes dans leur différenciation vers un état mémoire.

Pour reconnaître un pathogène, une cellule infectée ou tumorale et intervenir pour leur élimination, il est nécessaire que les lymphocytes T CD4 ou CD8 naïfs soient « éduqués ». Il est établi que trois signaux sont nécessaires à cette éducation conduisant à leur activation et leur différenciation en cellules mémoires effectrices : l'engagement du TCR avec reconnaissance du peptide présenté sur une molécule de CMH, un signal de costimulation (*via* la liaison de la chaîne CD28 aux molécules de costimulation CD80 ou CD86 portées par les CPAg) ainsi que la présence de cytokines sécrétées par la CPAg ou d'autres cellules du microenvironnement immunitaire. Cette activation se déroule dans des organes spécifiques appelés organes lymphoïdes secondaires (OLS) lieu de rencontre entre les LT et CPAg et dans lesquels les LT sont éduqués et activés pour donner naissance à un ensemble de clones de lymphocytes T mémoires spécifiques du peptide antigénique présenté. Les OLS regroupent les ganglions répartis dans l'organisme, la rate, ainsi que les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), ces derniers jouant un rôle majeur dans l'immunité du tractus digestif notamment.

## **b. Différenciation des lymphocytes T**

Les LTCD8 effecteurs ont pour fonction première de lyser les cellules exprimant l'antigène qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement après éducation à la reconnaissance antigénique dans les OLS. Cette fonction, dite cytotoxique, est permise par la sécrétion de Perforine (Pfn) et le relargage de Granzyme B (GzB) qui assurent la

lyse de la cellule ciblée en déstabilisant la perméabilité de sa membrane lipidique et en induisant son apoptose respectivement (Berke, 1995; Hayashida et al., 2000). Les LTCD8 mémoires sont ainsi désignés sous l'appellation de lymphocytes T cytotoxiques (LTC). Les LTC sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que de l'interféron de type II (IFN- $\gamma$ ) ou du TNF- $\alpha$  à activité antiproliférative ou cytotoxique accentuant l'inflammation. Elles permettent d'attirer et d'activer d'autres cellules immunitaires (tels que les M $\phi$ ) pour détruire les cellules cibles (i.e. infectées ou anormales) et de restaurer un état d'homéostasie.

Sur le plan phénotypique, les lymphocytes T mémoires humains sont caractérisés par l'expression membranaire du variant CD45RO alors que les lymphocytes T naïfs expriment le variant CD45RA. Cependant, l'expression de CD45RA n'est pas exclusive du compartiment naïf. Cela est particulièrement le cas pour les LTCD8 dont une majorité de cellules mémoires ré-expriment le variant CD45RA en phase de différenciation terminale. De manière un peu plus précise, chez l'Homme, les stades de différenciation des lymphocytes T sont définis par l'expression différentielle de la combinaison des marqueurs de surface CD45RA et CCR7 (récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21) qui permet de distinguer les cellules mémoires circulantes ( $T_{CM}$ , CD45RA<sup>neg</sup>CCR7<sup>+</sup>), capables de re-circuler dans les OLS, les cellules mémoires effectrices ( $T_{EM}$ , CD45RA<sup>neg</sup>CCR7<sup>neg</sup>) qui migrent dans les tissus, et enfin les cellules mémoires effectrices différenciées de manière terminale et qui réacquièrent l'expression du marqueur CD45RA ( $T_{EMRA}$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>neg</sup>) (Andersen et al., 2006; Romero et al., 2007). CD62L, une sélectine exprimée à la surface des lymphocytes est également utilisée pour caractériser les différentes sous populations de LT (Sallusto et al., 1999). Comme CCR7, CD62L est essentiel pour la migration des LT dans les ganglions et est largement exprimé par les deux populations CCR7<sup>+</sup>. Son niveau d'expression sur les cellules CCR7<sup>neg</sup> est en revanche variable et il ne permet pas seul de bien distinguer les  $T_{EM}$  des  $T_{EMRA}$ . L'ensemble de ces populations est régulé par des mécanismes divers qui peuvent être intrinsèques (apoptose programmée pour conserver un contingent de LTC nécessaire et suffisant, expression de points de contrôle immunitaires (ICP)) ou extrinsèques (modulation d'action et de prolifération par des cellules régulatrices comme les lymphocytes T régulateurs (Treg)) pour assurer une protection de l'organisme face à des agressions futures tout en évitant l'apparition de phénomènes auto-immuns.

De même que les LTCD8, les LTCD4 éduqués et différenciés dans les OLS acquièrent un phénotype de cellules mémoires sous l'influence de différents signaux. Ils sont également subdivisés en différentes populations effectrices en fonction de leur expression de CD45RA, CCR7 et CD62L qui dictent leur localisation et influencent leur action (Farber et al., 2014). Leur fonction principale consiste en la sécrétion de grandes quantités de cytokines pro- ou anti-inflammatoires qui vont influencer la réponse immunitaire. Ils ont en effet un rôle dans l'initiation et le maintien des réponses des LTCD8 et des LB et contribuent à leur activation. En cela ils sont désignés sous le terme de populations T « helper » (Th). En fonction des tissus dans lesquels ils interviennent ainsi que de la nature du danger identifié les Th recrutés ont des signatures moléculaires et fonctionnelles qui diffèrent, leur permettant de cibler de la manière la plus efficace la menace détectée (Kumar et al., 2018). De nombreux travaux ces dernières années ont permis d'étoffer la vision que nous avons de la réponse LTCD4 qui est divisée en de nombreuses populations Th spécialisées. Je me propose de décrire plus en détail dans la partie qui suit ces populations de Th. La multiplicité de la réponse LTCD4 et sa compréhension ont en effet largement influencé mon travail de thèse.

## **2. FOCUS SUR LA REPOSE T CD4<sup>+</sup> : LES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE T EFFECTEURS MEMOIRES HELPER**

Lors de leur activation dans les OLS, les LTCD4 acquièrent rapidement la capacité à sécréter de l'IL-2 qui permet d'amplifier leur activation et leur prolifération en agissant de manière autocrine *via* son récepteur IL2R comprenant la chaîne spécifique CD25 ou IL-2R $\alpha$ . Les LTCD4 expriment par ailleurs des récepteurs spécifiques d'autres cytokines (par exemple : IL-12, IL-4, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23, TGF- $\beta$ ) qui, lorsqu'ils sont engagés avec leurs ligands, vont induire des programmes de transcription génique spécifiques. La composition du microenvironnement cellulaire et moléculaire au site d'activation des LTCD4 va ainsi influencer sur la fonction de ces cellules selon un processus appelé la polarisation T helper. Les combinaisons de signaux induites par ces diverses cytokines activent respectivement différents facteurs de transcription (Tbet, GATA-3, RORC, FoxP3) qui correspondent aux chefs d'orchestre, « master régulateurs » de la polarisation des LTCD4. Cette polarisation initiée par ces facteurs de transcription inclut la production de cytokines spécifiques et l'expression de différents récepteurs de chimiokines qui peuvent être utilisés comme marqueurs



phénotypiques des différentes sous-populations de Th. A la fin des années 1980, deux populations de Th étaient distinguées : les Th1 et les Th2 (Mosmann and Coffman, 1987). Ce modèle a persisté durant de nombreuses années, donnant lieu au paradigme Th1/Th2 basé sur la dualité complémentaire de ces deux types cellulaires (Parronchi et al., 1991). Les Th1 étant considérés comme les effecteurs de l'immunité LTCD4 alors que les Th2 étaient associés principalement à la réaction allergique. D'autres populations de Th ont été décrites depuis (Th17, Th22, et plus récemment Th1.17 et Th9) permettant d'élargir notre compréhension de la différenciation LTCD4 et laissant entrevoir une complexité bien plus importante du fait d'une grande plasticité dans la différenciation de ces cellules.

**a. Les Th1 sont impliqués dans la réponse à des agents infectieux viraux et bactériens et jouent un rôle central dans l'immunité anti-tumorale**

Les LTCD4 activés dans les OLS expriment fortement le récepteur spécifique de l'IL-12, composé des sous unités IL-12R $\beta$ 1 et IL-12R $\beta$ 2. L'IL-12 est une cytokine sécrétée par les CPAg activées ainsi que des cellules de l'immunité innée non présentatrices d'Ag telles que les neutrophiles. En se fixant à son récepteur, l'IL-12 permet l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT responsable de la phosphorylation de STAT4. La forme phosphorylée de STAT4 peut entrer dans le noyau où elle active la traduction du facteur de transcription T-bet, « master régulateur » de la différenciation Th1 (voir **Figure 1**). T-bet peut se fixer sur le promoteur du gène codant pour l'IFN- $\gamma$  (Szabo et al., 2000) et induit la production de cette cytokine par les cellules ainsi que l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR5. Les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (ligands de CXCR3) ainsi que CCL3 et CCL4 (ligands de CCR5) sont, à cet effet, les chimiokines principalement impliquées dans le recrutement des Th1 (Bonecchi et al., 1998). La sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LTCD4 différenciés ainsi que par les cellules NK amplifie ensuite la réponse Th1 en favorisant le maintien de la sécrétion de ces chimiokines au site de l'infection (Murphy and Reiner, 2002). De plus, l'IFN- $\gamma$  participe à la différenciation des monocytes en M $\phi$  de type M1 qui présentent un profil pro-inflammatoire entretenant également la réponse Th1. L'IFN- $\gamma$  augmente aussi la présentation des peptides antigéniques par le CMH de classe I par les CPAg qui est nécessaire à la reconnaissance des cellules cibles par les LTC effecteurs. Enfin l'IFN- $\gamma$

peut également avoir un effet antiprolifératif direct sur les cellules ciblées (Tabibzadeh et al., 1988; Wall et al., 2003). Les Th1, *via* leur production importante d'IFN- $\gamma$ , jouent ainsi un rôle central dans l'élimination de cellules infectées par des pathogènes intracellulaires ainsi que des cellules tumorales. L'IFN- $\gamma$  a en effet une action directe sur les cellules ciblées en induisant leur apoptose. Cette cytokine favorise également le développement des LTC et des M $\phi$  de type M1 qui contribuent activement à la lyse des cellules cibles. Une réponse Th1 erratique peut en revanche conduire à des désordres auto-immuns bien qu'ils ne soient pas les seuls impliqués dans le processus pathogénique comme nous le verrons dans les paragraphes suivants consacrés aux Th17 et aux Th1.17.

**b. Les Th2 sont impliqués dans la réponse antiparasitaire ainsi que dans l'orchestration de la réponse allergique**

S'il a été rapidement établi que l'IL-4 est la cytokine majeure impliquée dans cette polarisation en se fixant au récepteur IL-4R $\alpha$  induit par activation du TCR, il apparaît que son action n'est pas suffisante pour initier l'expression du facteur de transcription GATA-3, spécifique du profil Th2. En 2009, il a été montré que le T cell factor-1 (TCF-1) est nécessaire à l'expression précoce de GATA-3 et, parallèlement, à la régulation négative de la polarisation Th1 en inhibant la production d'IFN- $\gamma$  (Yu et al., 2009). Cette induction IL-4-indépendante de l'expression de GATA-3 est renforcée par l'action de l'IL-4 qui induit la phosphorylation de STAT6 et permet également l'expression de GATA-3. GATA-3 à son tour est capable de réguler négativement l'expression de STAT4 (nécessaire à la signalisation d'IL-12), ce qui inhibe également la polarisation Th1 (Usui et al., 2003). La différenciation Th2 est ensuite entretenue par une boucle de régulation autocrine, favorisée par les Th2 matures sécrétant eux-mêmes de grandes quantités d'IL-4. Sur le plan phénotypique, les Th2 humains sont caractérisés par l'expression du récepteur à la prostaglandine D2 (PGD2), CRTH2 (pour « chemoattractant receptor homologous expressed on Th2 cells ») également désigné DP2 (Cosmi et al., 2000; Jandl and Heinemann, 2017). Ce récepteur est également fortement exprimé par les basophiles et les « innate lymphoid cell 2 » ou ILC2 mais est exclusif des Th2 au sein des LTCD4. La PGD2 est considérée comme le médiateur prostaglandine majoritaire dans le contexte d'inflammation aigüe et joue un

rôle central dans le recrutement des éosinophiles et des Th2 *via* CRTH2. Les Th2 ont été, dans un premier temps, caractérisés par leur forte expression du récepteur de chimiokine CCR4 mais il s'avère que ce dernier n'est pas exclusif de cette population, il est en effet également exprimé par les Treg (Iellem et al., 2001; Yuan et al., 2007) ainsi que d'autres populations Th identifiées plus récemment comme les Th22 (Trifari et al., 2009). CCR4 a été également montré comme le marqueur d'une population de LTCD4 mémoires circulants ayant à la fois des propriétés Th1 et Th2 (Andrew et al., 2001).

Les Th2 sont largement décrits pour leur rôle dans l'immunité antiparasitaire notamment contre les helminthes, des parasites métazoaires multicellulaires des mammifères. L'activation des Th2 permet une protection de l'hôte contre ces agents extérieurs en réduisant leur nombre par neutralisation directe ou en favorisant leur expulsion des muqueuses (Allen and Sutherland, 2014). En plus de l'IL-4, les Th2 produisent également de l'IL-13 et de l'IL-5 qui favorisent la sécrétion de la chimiokine CCL11 par les cellules épithéliales des muqueuses (Neilsen and Bryce, 2010). CCL11 est impliquée dans la migration des éosinophiles qui contribuent aussi à la réponse antiparasitaire. La réponse Th2 permet également d'activer la réparation tissulaire nécessaire à la suite d'une infection par ces parasites (Chen et al., 2012).

Cette voie est également engagée dans l'allergie et l'asthme, l'IL-4 permettant également l'induction de la production d'IgE par les LB, qui est largement impliquée dans la réaction allergique. En combinaison avec le M-CSF, l'IL-4 favorise aussi la différenciation des monocytes en M $\phi$  de type M2 qui, à leur tour, entretiennent la polarisation Th2 en sécrétant de l'IL-10 (Mantovani et al., 2004). En revanche, associée au GM-CSF, l'IL-4 induit la différenciation des monocytes en cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC) et favorise la réponse Th2 en limitant leur production de cytokines inflammatoires de type Th1 par hypo-acétylation des gènes codant pour ces cytokines et augmente l'expression des gènes conduisant à une différenciation Th2 (forte expression d'IL-4 et IL-5) (López-Bravo et al., 2013). Cette polarisation des cellules myéloïdes vers un profil anti-inflammatoire associe les Th2 à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers (Ellyard et al., 2007; Shimato et al., 2012). Cependant, dans un modèle murin de myélome, il a été récemment montré que suite à un transfert adoptif de Th2 spécifiques d'antigènes tumoraux, la présence de ces cellules induit localement une réponse anti-tumorale de type 2 qui favorise l'inflammation *via* une infiltration massive de M $\phi$  M2 sécrétant de l'arginase (Lorvik

et al., 2016). Ces nouvelles données nécessitent donc de repenser la dualité des Th au sein des tumeurs qui présente les Th1 comme un inducteur et les Th2 comme un frein au développement de la réponse T anti-tumorale.

**Régulation épigénétique de la différenciation Th1/Th2 :** L'activation de voies de signalisation spécifiques et l'expression de facteurs de transcription lignage-dépendants des sous-populations Th1 et Th2 s'accompagnent de modifications épigénétiques héritables par les cellules filles et assurant la stabilité du phénotype (Wilson et al., 2009). Il est cependant admis que ces modifications épigénétiques laissent la place à des modulations induites par l'environnement si celles-ci sont plus importantes. Ainsi les séquences régulatrices du gène codant pour l'IFN- $\gamma$  sont invariablement déméthylées et portent des marques d'histones activatrices (acétylation de l'histone H3 et tri-méthylation en H3K4) dans les Th1 alors que ces mêmes régions sont méthylées et portent des marques épigénétiques répressives (tri-méthylation H3K27) dans les Th2. Des variations de l'environnement peuvent en revanche altérer ce maillage régulateur et conférer de nouvelles propriétés aux cellules se trouvant dans un contexte immunitaire inhabituel. Cela reflète le caractère plastique du processus de différenciation Th suggérant que les phénotypes Th1 et Th2 ne sont pas forcément figés.

### **c. Les Th17 : un lignage Th qui refonde la conception de la différenciation T helper**

#### **Découverte et caractérisation des Th17**

Dans la conception binaire divisant les Th en type 1 et 2, les Th1 étaient initialement désignés comme responsables de l'inflammation exacerbée et de la réponse T incontrôlée observées dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou la sclérose en plaques (SEP) et leurs modèles murins respectifs d'arthrite induite au collagène (AIC) et d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE). Toutefois et contre toute attente, l'utilisation de souris déficientes pour la production d'IFN- $\gamma$ , pour l'expression d'IFN- $\gamma$ R1 ou d'IL-12R $\beta$ 2 a mis en évidence pour la première fois un rôle protecteur d'IFN- $\gamma$  dans ces pathologies (Becher et al., 2002; Ferber et al., 1996).

Au début des années 2000 plusieurs études ont identifié l'IL-23, une cytokine de la famille de l'IL-12, comme cytokine clé dans le développement des pathologies auto-immunes. Sur le plan structural, l'IL-12 et l'IL-23 sont deux hétérodimères qui partagent une sous unité commune (IL-12p40) et ont une chaîne spécifique (IL-12p35 et IL-23p19 respectivement). Ces études ont permis d'établir que des souris KO pour la chaîne spécifique d'IL-23 sont résistantes à l'induction d'EAE ou d'AIC (Langrish et al., 2005) alors que des souris KO pour IL-12p35 ne sont pas protégées (Gran et al., 2002) démontrant un rôle délétère de l'IL-23 dans les maladies auto-immunes (Cua et al., 2003) par le maintien d'une population très pro-inflammatoire capable de sécréter de l'IL-17A : les Th17 (Harrington et al., 2005). L'axe IL-23/IL-17 plus que le duo IL-12/IFN $\gamma$  a dès lors été placé au premier plan dans la compréhension de l'inflammation exacerbée et chronique caractéristique des pathologies auto-immunes.

Une étude plus détaillée des Th17 a permis d'établir qu'il s'agit d'un lignage indépendant des Th1 et des Th2 dont le maintien des fonctions pro-inflammatoires est dépendant de l'IL-23 et est au contraire inhibé par les cytokines Th1 et Th2, IFN $\gamma$  et IL-4. Les Th17 différenciés expriment en effet fortement l'IL-23R qui assure une boucle d'entretien IL-23-médié du phénotype Th17. En plus de sécréter de l'IL-17A, les Th17 peuvent sécréter de l'IL-17F, de l'IL-21, de l'IL-22 et du TNF- $\alpha$  en grandes quantités (Dong, 2008). Plus récemment, il a été montré que les Th17 humains sont également capables de sécréter de l'IL-26, une cytokine capable de former des pores dans les parois bactériennes contribuant ainsi à l'élimination directe des bactéries extracellulaires (Meller et al., 2015). Les Th17 expriment aussi fortement le récepteur de chimiokine CCR6 dont le ligand, CCL20, est produit en grande quantité par les cellules épithéliales dans un contexte d'inflammation, assurant ainsi leur recrutement au site de l'infection (Singh et al., 2008). En termes de régulation, le récepteur nucléaire RORC (ROR $\gamma$ t chez la souris) est le facteur de transcription « master régulateur » du phénotype Th17 (Manel et al., 2008; Wilson et al., 2007).

### **La question de la différenciation Th17 chez l'Homme**

Les paramètres permettant la différenciation des LTCD4 naïfs en Th17 sont plus complexes que pour les Th1 et les Th2 et nécessitent de s'y attarder. La force du signal TCR est notamment un facteur important pour permettre aux LT naïfs d'engager le programme de différenciation Th17, un signal TCR faible favorisant les réponses Th17

par rapport à un signal fort (Purvis et al., 2010). Par ailleurs, la présence dans l'environnement de plusieurs cytokines est nécessaire pour l'induction de RORC. Chez la souris, il est clairement établi qu'une combinaison d'IL-6 et de TGF- $\beta$  est nécessaire et suffisante à l'induction de l'expression de ROR $\gamma$ t, IL-23 étant associé à l'expansion et à la survie des Th17 plus qu'à leur différenciation à proprement parler (Stritesky et al., 2008). Chez l'Homme en revanche, l'IL-1 $\beta$  en combinaison avec l'IL-6 ou l'IL-23 semble nécessaire (Acosta-Rodriguez et al., 2007). L'implication du TGF- $\beta$  dans cette cascade de différenciation est encore aujourd'hui controversée avec des études montrant que le TGF- $\beta$  inhibe la sécrétion d'IL-17A (Unutmaz, 2009) quand d'autres prônent l'utilisation de faibles quantités de TGF- $\beta$  pour induire la différenciation de LTCD4 naïfs en Th17 *in vitro* (Volpe et al., 2008). Ces différences pourraient venir des conditions de culture, notamment du sérum et du milieu utilisés qui peuvent contenir du TGF- $\beta$  et des agonistes du récepteur nucléaire AhR respectivement et qui sont des modulateurs connus de la différenciation Th17 (Veldhoen et al., 2009). L'IL-21 et l'IL-23 interviennent également dans le maintien et l'entretien du phénotype Th17. A la suite de l'induction de la différenciation Th17, à l'instar de ce qui est observé pour les Th1 et les Th2, certains gènes sont rapidement régulés, contribuant ainsi à l'amplification du signal de différenciation (Tuomela et al., 2012).

### **Implication des Th17 dans la résolution des infections et dans les pathologies auto-immunes**

Les Th17 interviennent dans la réponse immunitaire dirigée contre les pathogènes extracellulaires en permettant le recrutement rapide des neutrophiles. L'IL-17A induit en effet la production d'IL-8, un fort chemo-attractant des neutrophiles, par les cellules stromales et endothéliales (Roussel et al., 2010). Les Th17 induisent également la production de M-CSF et de GM-CSF permettant l'activation des M $\phi$  au site de l'infection. Ainsi des modèles de souris déficientes en Th17 (IL-17RKO, IL-23p19 KO) sont plus sensibles à des infections bactériennes (ex : *K. Pneumoniae*, *E.coli*, *M. Tuberculosis*) du fait d'un moindre recrutement des neutrophiles dans les tissus infectés et d'une diminution de phagocytose des pathogènes qui engendre une perte de contrôle rapide de la progression de l'infection (Ye et al., 2001). Chez les souris non déficientes, des expériences de vaccination ou de stimulation antigénique ont permis de montrer que l'IL-17A est produit rapidement après injection de *M. Tuberculosis* et est associé à la production d'IL-23.

En revanche, une réponse Th17 incontrôlée due à une stimulation antigénique chronique ou à un défaut de régulation de reconnaissance d'antigènes du Soi proche d'antigènes de pathogène est à l'origine de nombreuses pathologies auto-immunes. L'implication directe de l'IL-17A dans la physiopathologie de ces affections a été confirmée dans plusieurs études menées chez la souris, où l'utilisation d'anticorps bloquants anti-IL-17A ou de modèles déficients pour IL-17A empêchent le développement d'EAE ou d'AIC (Hofstetter et al., 2005; Nakae et al., 2003). Chez l'Homme, l'implication des Th17 dans les maladies auto-immunes a été largement étudiée notamment dans les pathologies arthritiques. Des concentrations sériques élevées de cytokines spécifiques des Th17 (IL-17A, IL-22) ainsi qu'une augmentation transcriptionnelle de l'expression de RORC et de plusieurs cytokines (IL-26, IL-17A, IFN $\gamma$ ) dans des lésions psoriasiques comparées à de la peau humaine normale ont ainsi été corrélées à la sévérité de la maladie chez des patients atteints de psoriasis (Pso) (Wilson et al., 2007). Dans la PR, il a également été mis en évidence des niveaux élevés de cytokines Th17 dans le plasma ou le liquide synovial des patients (Kotake et al J Clin Invest 1999, Shen et al Arthritis Rheum 2009). La présence de fortes concentrations d'IL-23p19 dans le sérum ou les lésions de patients suggère également l'implication de la voie IL-17/IL-23 dans ces pathologies. Cependant de récentes études ont démontré que les Th17 ne sont pas les seuls LTCD4 capables de produire de l'IL-17A. Certains lymphocytes T $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, T17) sont en effet également capables de produire de grandes quantités d'IL-17A et sont largement présents dans la peau où ils participent à l'intégrité des tissus. Ils ont, de fait, été récemment caractérisés dans la pathogenèse du Pso (Cai et al., 2011; Campbell et al., 2017). Nos investigations ne nous ont pas menés à détailler les mécanismes biologiques associés à ces cellules mais il est important de le garder en mémoire. D'autres LTCD4 conventionnels, identifiés plus récemment du fait de leur phénotype hybride sont également capables de produire de l'IL-17A. Ce sont ces dernières que j'ai plus précisément étudiées.

#### **d. Les Th1.17 ou Th17 pathogéniques : une population hétérogène polyfonctionnelle**

Le développement des techniques de biologie cellulaire (cytométrie en flux multiparamétrique, immuno-essais multiplex sur mélange de cellules ou sur cellule

unique) et moléculaire (RNAseq, séquençage haut débit) pour l'analyse détaillée des sous-populations de Th ont permis d'identifier une population de Th co-sécrétrice d'IL-17A et d'IFN- $\gamma$  qui possède les caractéristiques phénotypiques (co-expression des récepteurs de chimiokine CXCR3 et CCR6 et des facteurs de transcription T-bet et RORC) propres à la fois aux Th1 et aux Th17. Cette population de Th « hybride » est désignée sous le nom de Th1.17 ou encore « Th17 pathogénique » du fait de son implication avérée dans de nombreuses pathologies, notamment auto-immunes (Boniface et al., 2010; Kebir et al., 2009). Le fait que l'IFN- $\gamma$  ait longtemps été considéré comme seul responsable de la physiopathologie de plusieurs désordres auto-immuns pourrait notamment s'expliquer par l'existence de cette population Th1.17 qui, de fait, sécrète de l'IFN- $\gamma$  mais aussi d'autres facteurs solubles (IL-17A, GM-CSF, IL-3), également délétères dans les tissus inflammés. La caractérisation du rôle de l'IL-17A ainsi que l'évolution des techniques de cytométrie en flux multiparamétriques ont donc permis de préciser l'implication réelle de l'IFN- $\gamma$  et des autres cytokines pro-inflammatoires dans ces processus pathologiques.

Les facteurs solubles nécessaires à la différenciation Th1.17 ne sont encore aujourd'hui pas clairement définis. Des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la différenciation Th17 (IL-6, IL-23) semblent requises à l'exception de TGF- $\beta$  (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Hakemi et al., 2011). Une polarisation réalisée *in vitro* en absence de ce dernier conduit en effet à la différenciation de cellules capables de sécréter à la fois de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$ . La combinaison IL-6/IL-1 $\beta$  semble également fortement favoriser la différenciation de cellules capables de sécréter de l'IL-17A, de l'IL-22 et de l'IFN- $\gamma$ . Il a également été montré par d'autres que l'IL-1 $\beta$  favorise un processus de différenciation menant à des Th1.17 plutôt que des Th17 (Duhon and Campbell, 2014). Enfin des Th17 placés dans un milieu riche en IL-12, IL-23 et IL-1 $\beta$  semblent également acquérir un phénotype Th1.17 voire Th1 « non-classiques », produisant de l'IFN- $\gamma$  et du GM-CSF, en cas d'exposition prolongée à cette combinaison de cytokines (Annunziato et al., 2015).

Les Th17 non-pathogéniques ont été distingués des Th1.17, dans un premier temps chez la souris, par leur capacité à sécréter de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (McGeachy et al., 2007). Cette capacité est perdue par les Th1.17 qui sécrètent en revanche de l'IFN- $\gamma$  en plus de l'IL-17A. L'analyse de la signature génique associée à ces deux populations a permis de mettre en évidence, dans les Th1.17 par rapport aux



Th17, une surexpression des gènes codant pour CXCL3, IL-22, IL-3, CCL4, GzB, LRMP, CCL5, GM-CSF, CCL3, T-bet, ICOS, IL-7R, STAT-4, GAL-3, LAG-3 associée à une réduction de l'expression des gènes codant pour IL6-ST, IL1RN, MAF, AHR, IL-9 et IL-10 (Lee et al., 2012).

Chez l'Homme, un profil similaire a été identifié suite à une réponse à des infections par des bactéries extracellulaires. Les LTCD4 spécifiques de *C. albicans* sont ainsi de type Th1.17 de par leur capacité à co-produire à la fois de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$  (Zielinski et al., 2012). Une étude récente chez l'Homme montre que cette population présente une signature génique et fonctionnelle similaire à celle décrite chez la souris (Ramesh et al., 2014). Les Th1.17 sont en effet capables de produire de grandes quantités d'IL-17A, d'IFN- $\gamma$  ainsi que d'IL-17F, d'IL-22, d'IL-3, et de GM-CSF et expriment fortement CCL5, CCL4, GzB tandis qu'ils down-régulent IL-10 et IL6-ST entre autres.

Cette étude démontre également que les Th1.17 sur-expriment le transporteur ABC P-glycoprotéine (P-gp ou MDR1), impliqué dans l'efflux de molécules utilisées notamment en thérapie à des doses variables dans certaines maladies auto-immunes ou en oncologie (anthracyclines, vinca-alcaloïdes, glucocorticoïdes, cf. **chapitre 4**). Ces cellules, impliquées dans les pathologies auto-immunes et exprimant MDR1, pourraient donc être un point clé des résistances à des immunosuppresseurs de type glucocorticoïdes observées dans des maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn (Ramesh et al., 2014).

### **Présence et impact des Th17 et des Th1.17 dans les tumeurs chez l'Homme et la souris :**

De nombreuses équipes ont démontré que les Th17 et les Th1.17 infiltrent les tumeurs solides (Ye et al., 2013). Dans les tumeurs du sein et de l'ovaire, pathologies auxquelles je me suis intéressée dans le cadre de ce travail de thèse, l'impact des Th17 reste controversé en partie à cause de leur plasticité fonctionnelle. Dans le cancer du sein, la production d'IL-17A par les LTCD4 est associée au sous-type de tumeurs agressives dites triple négatives (n'exprimant pas les récepteurs hormonaux aux œstrogènes (ER<sup>neg</sup>) et progestérone (PR<sup>neg</sup>) et ne surexprimant pas le récepteur Her2/neu) (Benevides et al., 2013). Dans le cancer du sein de manière générale, la présence d'IL-17A dans l'environnement tumoral est un facteur de mauvais pronostic indépendant

pour la survie sans rechute (Benevides et al., 2013; Chen et al., 2013; Zhang et al., 2009) qui peut s'expliquer par le rôle d'IL-17A dans la survie et les capacités invasives des cellules tumorales (Zhu et al., 2008), dans la promotion de la néo-angiogénèse *via* l'induction de VEGF (Chung et al., 2013) et dans le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et de neutrophiles pro-tumoraux qui participent à l'inhibition de la réponse anti-tumorale (Novitskiy et al., 2011; Welte and Zhang, 2015). Chez la souris, des données montrent également un effet accélérateur de l'IL-17A sur la progression tumorale et sa neutralisation dans des modèles murins de tumeurs mammaires permet le contrôle de la croissance tumorale (Benevides et al., 2015). Dans le cancer de l'ovaire en revanche, la détection de LTCD4 qui co-expriment IL-17 et IFN $\gamma$  est associée à un bon pronostic (Kryczek et al., 2009; Lan et al., 2013). Du fait de leur capacité à produire de l'IFN $\gamma$ , ces Th1.17 peuvent exercer une activité anti-tumorale, contrairement aux Th17 qui, *via* l'activité pro-angiogénique de l'IL-17A, favorisent la croissance tumorale (Martin-Orozco et al., 2009). Par ailleurs, cette population Th1.17 est favorisée par la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les M $\phi$  associés aux tumeurs (TAM) présents dans ces tumeurs (Kryczek et al., 2009). La présence de Th1.17 dans des modèles murins de mélanome est également associée à une forte réponse anti-tumorale (Muranski et al., 2008). Au-delà de leur capacité à sécréter de l'IL-17A, ces populations de Th pourraient donc avoir un impact pronostic variable en fonction des facteurs environnants influant sur leur phénotype et leur capacité fonctionnelle tels que le passage d'un profil Th17 non pathogénique pro-tumoral produisant IL-17A et IL-10 à un profil Th1.17 anti-tumoral notamment.

Loin de la conception binaire initialement décrite, les différentes populations de cellules Th constituent donc un continuum hétérogène régulé par des mécanismes multiples largement influencés par le microenvironnement immunitaire. La plasticité de ces cellules, même différenciées, en fait un sujet d'étude délicat où il est de mise de multiplier les marqueurs pour apprécier leur réelle variété. Bien que ces cellules aient une signature épigénétique distincte, des phénomènes de reprogrammation sont observés, notamment entre les Th1, Th1.17 et Th17, induisant l'activation de nouvelles voies de signalisation permettant l'expression d'IL-17A par des Th1 ou d'IFN- $\gamma$  par les Th17 sans pour autant que ceux-ci perdent leur identité première (Cohen et al., 2011). Les Th1.17 pourraient donc représenter un sous-type hétérogène de Th composé de

Th1 et de Th17 exposés à différents facteurs induisant leur poly-fonctionnalité. Récemment, des Th1 non conventionnels ont également été décrits (Annunziato et al., 2015). Ils diffèrent des Th1.17 par leur absence de production d'IL-17A mais leur ressemblent de par leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  et du GM-CSF, une cytokine initialement identifiée comme sécrétée uniquement par le contingent Th17.

D'autres populations de Th, plus minoritaires ont également été récemment décrites. Je les présente brièvement ci-après en m'attardant un peu sur les Th22 dont le rôle pathogénique est de plus en plus étudié dans des pathologies arthritiques telles que la PR ou le rhumatisme psoriasique (RPso), pathologies auxquelles je me suis particulièrement intéressée au cours de ma thèse.

### **e. Les Th22 : impliqués dans l'immunité des muqueuses**

En condition physiologique, l'IL-22 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales, notamment au niveau de la peau où elle favorise la prolifération des kératinocytes et la production de peptides anti-microbiens (Eyerich et al., 2009). Cette cytokine, initialement apparentée aux Th17 puisque produite par ces cellules, est également produite par d'autres Th : les Th22. A la différence des Th17, les Th22 sécrètent de l'IL-22, sans co-produire d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-17A (Duhon et al., 2009; Liang et al., 2006; Trifari et al., 2009) et ont été, dans un premier temps, caractérisés dans les lésions psoriasiques où ils sont enrichis (Eyerich et al., 2009). Chez la souris, des données récentes suggèrent en revanche que les Th22 produisent également de l'IL-13 et des molécules de type granzymes (Plank et al., 2017). Sur le plan phénotypique, ils sont caractérisés par la co-expression des récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR10, qui permettent leur relocalisation privilégiée dans les tissus cutanés, plus particulièrement dans l'épiderme, et les muqueuses en réponse aux chimiokines CCL17 et CCL22 produites par les cellules épithéliales. Les Th22 jouent un rôle essentiel dans l'immunité de l'épiderme et des muqueuses ainsi que dans le remodelage tissulaire, *via* l'activation de la voie STAT-3 par l'IL-22 (Pickert et al., 2009). Ils sont également caractérisés par l'expression des facteurs de transcription T-bet et AhR mais n'expriment pas RORC ou GATA-3. Le profil Th22 peut être induit suite à l'activation de LTCD4 naïfs par les DC plasmacytoïdes (pDC) qui sécrètent de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  après stimulation *via* des ligands de TLR7 et 9. Ce phénotype, par

opposition aux phénotypes Th1, Th2, et Th17 semble stable et résistant aux cytokines intervenant dans la polarisation des autres populations Th.

### **Implication des Th22 dans différentes pathologies auto-immunes et dans les syndromes allergiques :**

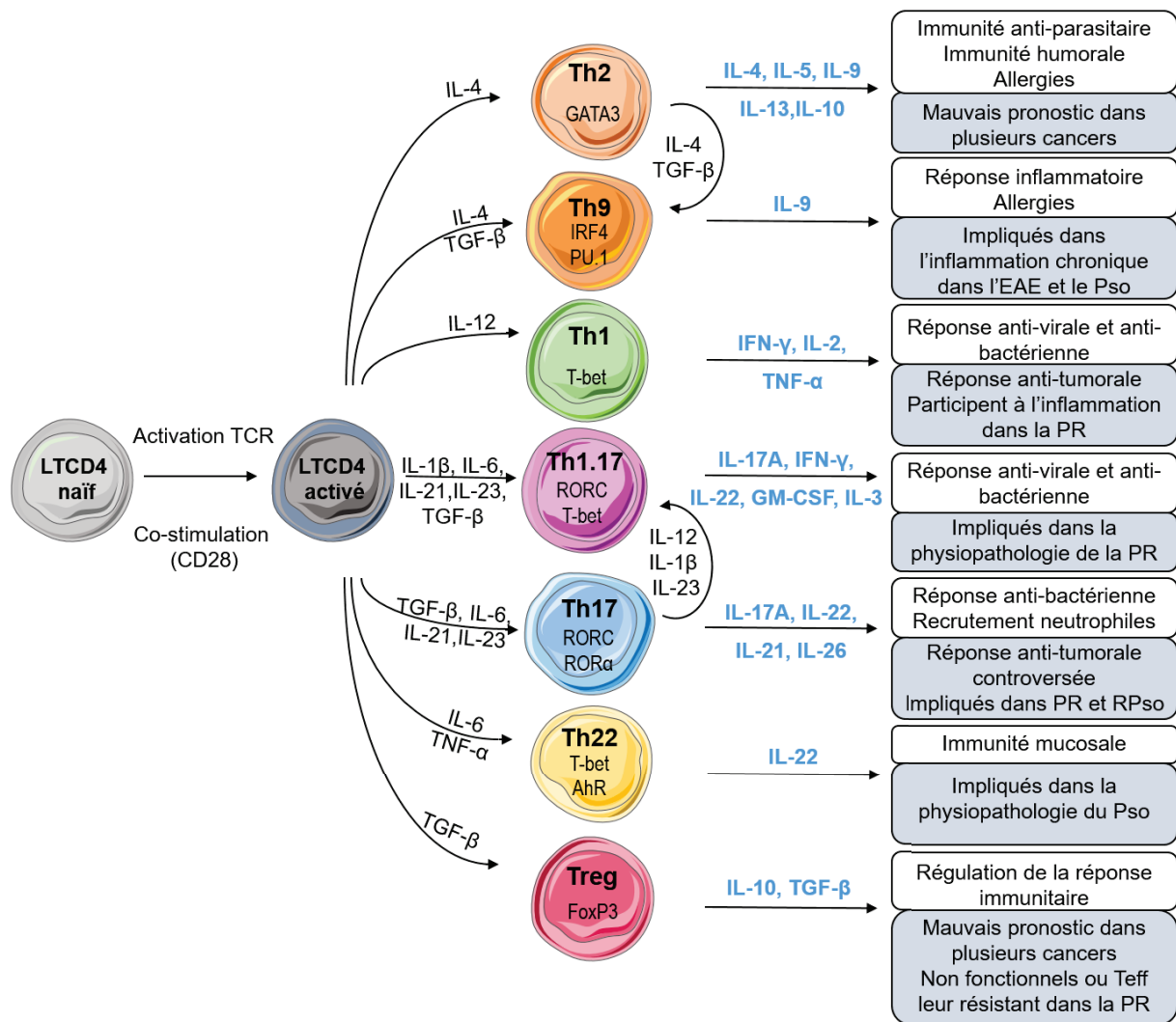
Chez les patients atteints de Pso, les Th22 sont enrichis dans le sang et les lésions psoriasiques (Boniface et al., 2007). L'hyper activation des pDC observée dans ces lésions pourrait expliquer l'abondance anormale de Th22 dans cette pathologie mais leur rôle exact dans la physiopathologie de la maladie reste cependant à élucider. Des données récentes suggèrent également une implication des Th22 dans la PR agissant de concert avec les Th17 (Benham et al., 2013). Plus récemment, l'IL-22 a été identifiée comme la cytokine clé dans l'initiation de la dermatite atopique (DA) dans des modèles murins (Glocova et al., 2017). Les Th22 ont par ailleurs été caractérisés dans l'infiltrat inflammatoire de pathologies respiratoires chroniques comme l'asthme (Tamasauskiene and Sitkauskiene, 2017). Ces données mettent en évidence le rôle ambivalent de l'IL-22 qui est à la fois une cytokine pro et anti-inflammatoire, nécessaire à de nombreux mécanismes physiologiques mais délétère dans des contextes d'inflammation chronique. Enfin, des données récentes décrivent l'IL-22 comme une cytokine pro-tumorale dans différents types de tumeurs chez la souris et chez l'Homme, favorisant notamment la survie des cellules tumorales ainsi que la réalisation de la transition épithélio-mésenchymateuse (Lanfranca et al., 2017; Voigt et al., 2017).

### **f. Les Th9 : des fonctions inflammatoires pléiotropes**

L'IL-9 a, dans un premier temps, été identifiée comme une cytokine associée aux Th2 (Temann et al., 1998). Il a en effet été montré que des cellules exprimant constitutivement GATA-3 étaient capables d'activer la voie STAT5 nécessaire à la production d'IL-9. Cependant, le TGF- $\beta$  est également capable d'activer la production d'IL-9 et la stimulation TCR de LTCD4 naïfs de souris en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4 induit la différenciation de Th « non Th2 » produisant de l'IL-9 appelés Th9. La production d'IL-9 n'est cependant pas restreinte à cette population, les Th17 ainsi que des Treg peuvent en effet également en produire. De même, les Th9 sécrètent

également de l'IL-10 et de l'IL-21 chez la souris (Dardalhon et al., 2008a; Veldhoen et al., 2008). Le programme transcriptionnel responsable de la différenciation Th9 n'est pas complètement élucidé. Plusieurs facteurs de transcription semblent participer à cette polarisation : GATA-3 et STAT-6, qui sont aussi impliqués dans la polarisation Th2, IRF-4, qui joue un rôle dans la polarisation Th17, et PU.1, dont l'expression est augmentée par le TGF- $\beta$  ont à ce jour été identifiés (Végran et al., 2015).

L'IL-9 a pour cible principale les mastocytes et induit leur dégranulation et leur prolifération. Les Th9 jouent ainsi un rôle dans les réponses allergiques des voies respiratoires et des tissus intestinaux dans lesquels la prolifération accrue des mastocytes, appelée mastocytose, en réponse à des allergènes peut être observée (Osterfeld et al., 2010). L'IL-9 régule également des sous-populations de LTCD4 comme les Th17 et les Treg. Chez la souris dans le modèle d'EAE, la production d'IL-9 par les Th9 a des conséquences différentes des Th1 ou des Th17 sur la physiopathologie de l'affection (Jäger et al., 2009). En effet, l'IL-9 module différemment la sévérité de l'EAE selon qu'elle cible les Treg, inhibant alors le développement de la pathologie, ou les Th17, favorisant une accentuation des signes cliniques (Elyaman et al., 2009). La présence de niveaux élevés d'IL-9 dans le sérum de patients atteints de PR a également été récemment investiguée et semble associée à la pathologie dans sa forme établie (Ciccia et al., 2015) mais pourrait également être un marqueur des stades initiaux de la pathologie (Hughes-Austin et al., 2013).



**Figure 1 : Diversité et plasticité de la polarisation Th chez l'Homme.** Les cytokines nécessaires à la différenciation des sous populations de Th sont indiquées en noir. Les cytokines sécrétées par les populations de Th différenciées sont indiquées en bleu. Les fonctions immunitaires génériques dans lesquelles les populations participent sont indiquées dans des cadres blancs. Les implications des différents sous-types cellulaires dans des contextes pathologiques tumoraux ou auto-immuns sont indiqués dans les cadres gris. (Adapté de Annuziato et al Immunology 2015, Karcewski et al Autoimmunity 2016, Dong et al Nat Rev 2008, Noel et Nowak Nat Immunol 2010)

### **3. REGULATION DE LA REPOSE T**

Le système immunitaire adaptatif est composé de nombreuses populations cellulaires -notamment de lymphocytes T détaillées plus haut- complémentaires, dont l'action concertée repousse toute tentative de persistance d'éléments pathogènes viraux ou bactériens dans les tissus. Cependant, des mécanismes contrebalancent les boucles d'amplification de la réponse immune qui ne sont plus nécessaires une fois que le danger est contrôlé. A cet effet, le système immunitaire comprend des populations tolérogènes et régulatrices telles que les CPAg immatures incluant les DC suppressives et les M $\phi$  de type M2 qui contribuent à la régulation négative de la réponse immune. Des cellules régulatrices ont aussi été identifiées parmi les lymphocytes B (Breg) (Rosser and Mauri, 2015). Certaines populations de LTCD8 et LTCD4 ont également des propriétés suppressives (Joosten and Ottenhoff, 2008; Xu et al., 2016). La population régulatrice majeure de la réponse immune reste les Treg qui jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie immunitaire (Takahashi et al., 2000). En cas d'emballement du système, ces cellules régulatrices perdent leur capacité de contrôle de la réponse immunitaire ce qui se traduit par une baisse de tolérance des cellules immunes envers des antigènes du Soi et constitue le point de d'initiation des pathologies auto-immunes.

#### **a. Les T régulateurs (Treg)**

Les Treg naturels (nTreg) sont principalement générés dans le thymus, et dépendent de l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Fontenot et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Chez l'Homme, les nTreg sont définis par l'expression constitutive de CD25, l'absence d'expression de CD127 ainsi que l'expression nucléaire de FoxP3.

Les Treg peuvent également être générés en périphérie notamment lors d'une stimulation antigénique sub-optimale de LTCD4 naïfs. En l'absence de signaux de co-stimulation, les CPAg immatures favorisent la différenciation de LTCD4 suppresseurs spécifiques d'antigènes du Soi qui produisent de fortes concentrations d'IL-10 appelées Tr1 (Roncarolo et al., 2001), ou spécifiques d'antigènes du « non-Soi » appelé Th3 et produisant de grandes quantités de TGF- $\beta$  (Weiner, 2001).

L'activation des Treg est antigène-spécifique mais les mécanismes suppresseurs mis en jeu par ces derniers conduisent à une inhibition globale des cellules environnantes même si ces dernières ne présentent pas la même spécificité antigénique (Thornton and Shevach, 2000). Des études récentes montrent cependant qu'il n'y a pas une mais des populations de Treg de phénotype  $CD4^+CD25^{high}CD127^{neg}Foxp3^+$  qui reflètent la diversité des populations Th car elles peuvent exprimer les facteurs de transcription et les récepteurs aux chimiokines spécifiques des différentes populations de Th (Duhon et al., 2012). Les Treg sont de fait classifiés en Th1-like ( $T-bet^+$  ou  $CXCR3^+CCR6^{neg}CCR4^+CCR10^{neg}$ ), Th2-like ( $GATA-3^+$  ou  $CXCR3^{neg}CCR6^{neg}CCR4^+CCR10^{neg}$ ), Th17-like ( $RORC^+$  ou  $CXCR3^{neg}CCR6^+CCR4^+CCR10^{neg}$ ) ou Th22-like ( $CXCR3^{neg}CCR6^+CCR4^+CCR10^+$ ). Cela suggère que les Th et les Treg sont éduqués conjointement et que les populations effectrices et leur population régulatrice associée ont la capacité de migrer aux mêmes sites d'action. Des données récentes de séquençage ARN de cellule unique (« single cell RNAseq ») démontrent également cette diversité et semblent indiquer que bien que l'ensemble des Treg ait initialement les mêmes programmes génétiques initiaux activés (détection de transcrits FoxP3 dans chacune des cellules), des modulations de l'environnement, notamment la force du signal TCR, façonnent l'hétérogénéité de la population de Treg (Zemmour et al., 2018). De plus, il semble que des fonctions suppressives telles que la forte expression de CD25 et l'expression membranaire de l'ICP inhibiteur CTLA-4 soient communes à toutes les populations de Treg alors que d'autres ne sont portées que par des populations discrètes de Treg et permettent de les distinguer. Le paragraphe qui suit détaille brièvement ces différentes fonctions immuno-régulatrices. Celles-ci sont illustrées dans la **Figure 2**.

## **b. Les mécanismes d'immuno-régulation des Treg**

Les fonctions inhibitrices des Treg impliquent des molécules membranaires ou sécrétées qui régulent l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des populations immunes de différentes manières.

**Molécules membranaires** : Les Treg expriment fortement CD25 qui fixe l'IL-2 présente dans le milieu extracellulaire et empêche la prolifération des autres populations T nécessitant la présence d'IL-2 (de la Rosa et al., 2004). Les Treg



participent indirectement à l'inhibition de l'activation des LT en périphérie *via* leur forte expression membranaire de CTLA-4 (Takahashi et al., 2000). En effet, la molécule CTLA-4 présente une forte affinité pour les molécules de co-stimulation CD80/CD86 exprimées par les CPAg ce qui induit leur inhibition et entrave indirectement l'activation des populations T en entrant en compétition avec la fixation de CD28 aux molécules CD80/CD86 (Fraser et al., 1999; Linsley et al., 1992). Il semble également que la liaison de CTLA-4 à ses récepteurs sur les CPAg induit sur ces dernières une augmentation de l'activité de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) impliquée dans le catabolisme du tryptophane (Fallarino et al., 2003; Grohmann et al., 2002). L'activité accrue de IDO dans ces cellules conduit à une inhibition de leur maturation et l'établissement de mécanismes de tolérance. Les Treg expriment également l'ICP PD-1. Des données montrent que similairement à CTLA-4, PD-1 induit un rétro-signal inhibiteur lorsqu'il est engagé avec son ligand PD-L1 sur des CPAg induisant un phénotype suppresseur (Kuipers et al., 2006). D'autres ICP comme LAG-3, Tim-3 et TIGIT sont également présents à la surface de populations de Treg fortement immunosuppresseurs étudiés notamment en contexte tumoral. (Gao et al., 2012; Huang et al., 2004; Joller et al., 2014).

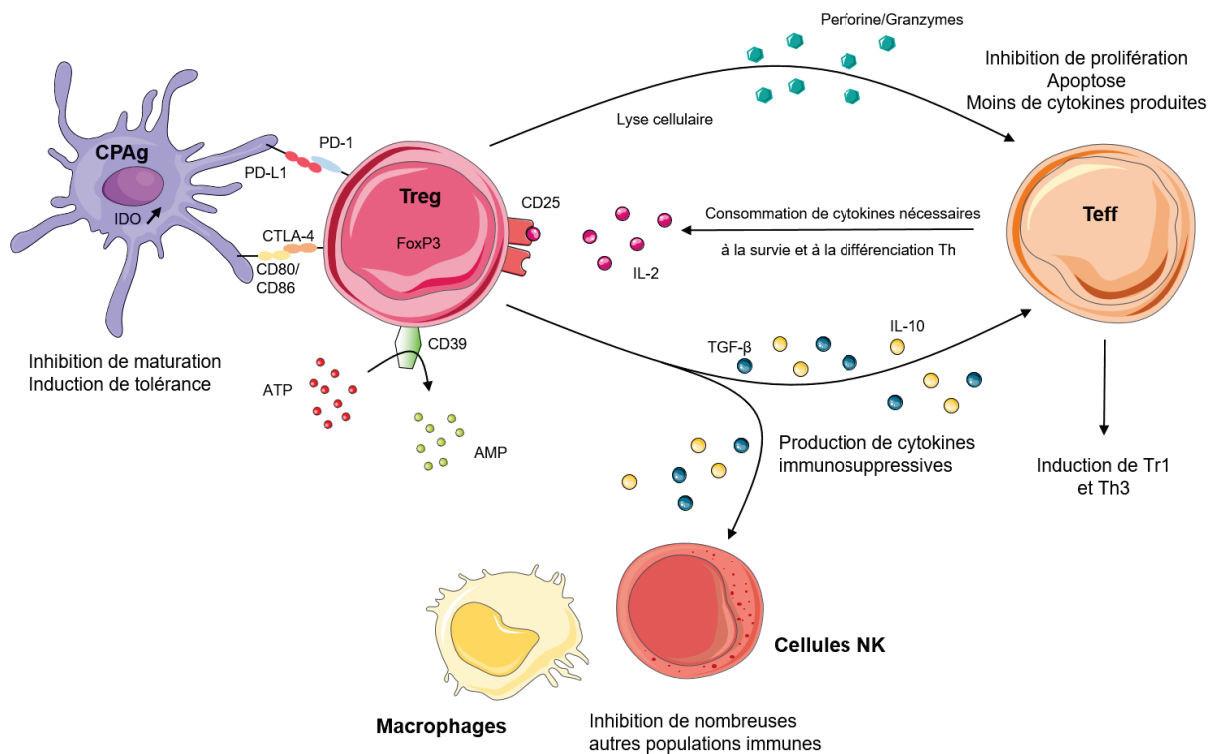
**Molécules sécrétées :** La fixation d'IL-2 sur son récepteur CD25 à la surface des Treg induit l'activation de la voie STAT-5 responsable de la sécrétion d'IL-10 (Tsuji-Takayama et al., 2008). Cette cytokine anti-inflammatoire active la voie JAK1/ STAT3 en se fixant à son récepteur IL-10R $\alpha$  et promeut l'expression de gènes anti-apoptotiques ainsi que du facteur SOCS3 qui inhibe la voie NF- $\kappa$ B et la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  (Mittal and Roche, 2015; Murray, 2005). L'activation de cette voie de signalisation aboutit à l'inhibition de la prolifération des LTCD4 et de leur sécrétion de cytokines (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) et à l'induction de la différenciation des LTCD4 naïfs en Tr1 ou Th3 (Malefyt et al., 1993; Taga et al., 1993). D'autre part, l'IL-10 altère indirectement la prolifération des LTCD4 en accentuant la polarisation des monocytes en M $\phi$  de type M2 *via* l'augmentation de leur expression du récepteur IL-4R $\alpha$  (Makita et al., 2015) et en inhibant la production d'IL-12 par les DC. L'IL-10 diminue également l'expression du CMH de classe II par les monocytes et les DC en empêchant l'expression à la membrane des molécules de CMH II *via* l'activation de l'ubiquitine ligase March-1 qui induit leur dégradation plutôt que leur adressage à la membrane (Koppelman et al., 1997; Mittal and Roche, 2015). Enfin, l'IL-10 inhibe la

présentation antigénique par les CPAg en interférant avec la signalisation TLR qui induit normalement un signal activateur de maturation des DC (Mittal and Roche, 2015).

Les Treg sont également capables de sécréter du TGF- $\beta$ , une cytokine pléiotrope déjà évoquée dans les processus de différenciation Th. Trois molécules (TGF- $\beta$ 1 à 3) sont identifiables dans la famille du TGF- $\beta$ . L'isoforme 1 est produit par les Treg et contribue de manière forte à leur arsenal suppresseur (Nakamura et al., 2004). Quel que soit le variant considéré, celui-ci est produit sous une forme latente inactive associée à la molécule LAP (« latency associated peptide »). Cette forme latente peut être exposée en membrane sur les Treg suppresseurs activés *via* l'expression de la molécule GARP (Tran et al., 2009). Elle peut également se lier au peptide LTBP (latent TGF- $\beta$ -binding protein) formant un complexe latent plus large encore. L'implication du TGF- $\beta$  dans ce complexe empêche sa fixation à ses récepteurs spécifiques et est un mécanisme de régulation d'action de cette molécule suppressive. Le TGF- $\beta$  doit ainsi être clivé pour être actif (Munger et al., 1999) et inhiber la prolifération et les fonctions effectrices des LTCD4 et LTCD8 par fixation à ses récepteurs (complexe TGF $\beta$ R1/R2) (Annes et al., 2004; Green et al., 2003). Certains Treg auraient également des fonctions cytotoxiques et seraient capables de lyser directement des cellules immunitaires *via* leur capacité à produire GzB (Loebbermann et al., 2012).

Enfin, les Treg contribuent à la production d'Adénosine (Ado) extracellulaire, un puissant immunosuppresseur, *via* la dégradation de l'adénosine tri phosphate (ATP) par l'ecto-enzyme CD39. Cette cascade immuno-régulatrice est détaillée dans la deuxième partie de cette introduction.

Les tumeurs malignes et les pathologies auto-immunes représentent deux contextes immunologiques qui sont souvent opposés du fait de l'action contraire d'un même type cellulaire dans ces deux situations pathologiques bien distinctes. C'est le cas des Treg qui sont largement représentés et activés dans l'environnement tumoral où ils favorisent l'immunosuppression (Curiel, 2007; Nishikawa and Sakaguchi, 2010) tandis que dans les maladies auto-immunes, ils sont moins fréquents et/ou non fonctionnels pour inhiber les cellules immunes pro-inflammatoires (Alice Long and Buckner, 2011).



**Figure 2 : Fonctions immunosuppressives des Treg chez l'Homme.** Ces mécanismes impliquent des contacts cellule-cellule, la production de molécules suppressives, des modifications métaboliques dans les DC par l'augmentation de l'activité d'IDO ou encore l'induction de l'apoptose de cellules immunes effectrices. (Adapté de Karcewski et al Autoimmunity 2016 et Jonuleit & Schmitt JI 2003)

## II. L'AXE CD39/CD73 DANS L'IMMUNO-REGULATION CHEZ L'HOMME

Le microenvironnement au site d'une réponse immunitaire contient de nombreux facteurs solubles qui influencent largement la réponse cellulaire qui s'y déroule. Parmi ces facteurs j'ai déjà évoqué les cytokines qui ont des rôles pro- ou anti-inflammatoires et interviennent dans différents aspects de la réponse immunitaire. Il existe de nombreuses autres molécules solubles comme les prostaglandines, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou certains nucléotides qui agissent sur la balance inflammatoire. Parmi les nucléotides présents dans le milieu extracellulaire, l'ATP et ses dérivés, l'adénosine mono phosphate (AMP) et l'Ado, ont des capacités immuno-régulatrices importantes. L'ATP et l'Ado en particulier ont des rôles opposés dans la régulation de la réponse immunitaire. La dégradation d'ATP en AMP puis en Ado *via*

l'action de deux ecto-enzymes membranaires majeures, CD39 et CD73, constitue une cascade métabolique modulant fortement la réponse immunitaire. Je me concentrerai ici sur ce qui est connu de cette cascade métabolique chez l'Homme et m'appuierai également sur des données provenant de modèles murins quand cela s'avèrera nécessaire.

## **1. L'ATP EXTRACELLULAIRE : ORIGINE ET FONCTIONS DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE**

### **a. Origine de l'ATP extracellulaire**

L'ATP est principalement connue pour ses multiples fonctions intracellulaires, servant de source d'énergie pour de nombreuses enzymes ou de nucléotide pour la néo-synthèse d'ADN (Khakh and Burnstock, 2009). L'ATP peut également se trouver dans le milieu extracellulaire suite à la libération d'ATP intracellulaire de manière passive par des cellules apoptotiques ou stressées, ou active par des transporteurs comme la Pannexine-1 dont l'activité est augmentée par des variations métaboliques, une activité caspase ou encore une augmentation du flux calcique (Yanguas Crespo et al., 2017). De ce fait, la concentration d'ATP extracellulaire est faible dans un tissu sain et est augmentée dans un tissu inflammé ou soumis à un stress (Schwiebert and Zsembergy, 2003; Trabanelli et al., 2012). C'est le cas des tissus tumoraux caractérisés par une forte hypoxie et une angiogenèse anarchique ou des tissus chroniquement inflammés dans le cas de désordres auto-immuns.

### **b. Les récepteurs de l'ATP et fonctions**

L'ATP extracellulaire a un rôle de signal de danger dans l'immunité et promeut l'inflammation *via* le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée en se fixant à ses récepteurs spécifiques, les récepteurs purinergiques P2 (Bours et al., 2006). La famille des récepteurs P2 regroupe les récepteurs ionotropiques P2X et les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) P2Y, comprenant chacun plusieurs entités dont la distribution biologique et l'affinité pour l'ATP varient. En fonction du récepteur engagé, les effets induits par l'ATP sont très différents. Les fonctions de l'ATP sur les

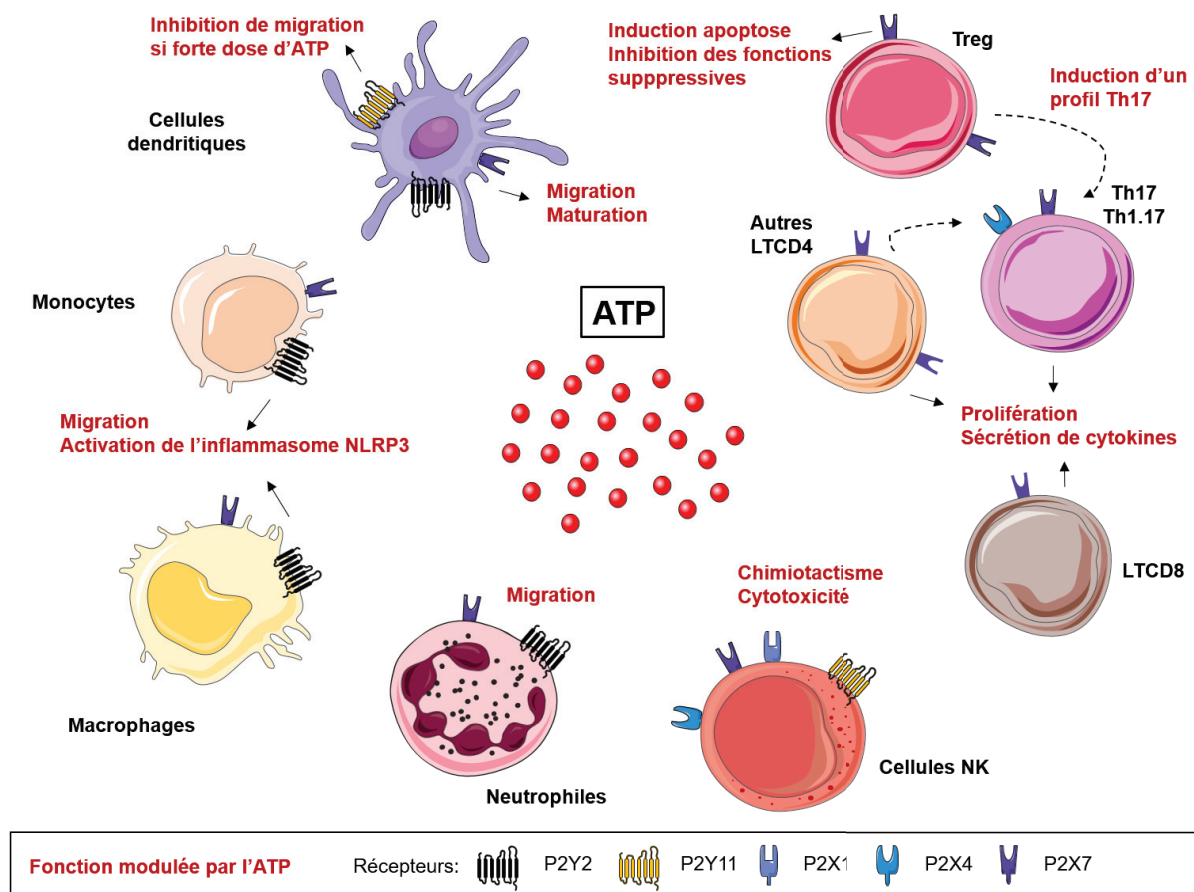
cellules du système immunitaire sont résumées dans la **Figure 3** qui clôt ce paragraphe.

#### **i. Action sur les cellules myéloïdes**

En se fixant à son récepteur P2Y2, l'ATP induit la motilité des neutrophiles mais aussi des monocytes et des M $\phi$  *via* une boucle d'activation autocrine faisant également intervenir le récepteur P2X7 sur les DC (Chen et al., 2006; Sáez et al., 2017). Cela permet leur recrutement au site d'infection et l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose (Chen et al., 2006; Elliott et al., 2009). En contexte tumoral, le recrutement ATP-dépendant de DC (dépendant de P2Y2) au site tumoral permet leur différenciation et contribue à la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace médiée par la présentation d'antigènes tumoraux (Ma et al., 2013a, 2013b).

Dans les monocytes et les M $\phi$  la fixation d'ATP à P2X7 contribue, de concert avec les ligands des récepteurs de l'immunité innée (PRR), à l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome NLRP3 mature active la caspase 1 et permet la maturation des formes non actives pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en formes actives sécrétées (Gicquel et al., 2015; Netea et al., 2009). L'ATP induit ainsi la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-18 par les M $\phi$  humains (Sakaki et al., 2013). Il favorise également leur polarisation en M1 pro-inflammatoires. Néanmoins, si la stimulation des monocytes ou des M $\phi$  par le signal ATP/P2X7 est prolongée, l'activation de la caspase 1 engendre, *a contrario*, un signal de mort dans ces cellules (Humphreys et al., 2000).

Parallèlement, *via* sa fixation au récepteur P2Y11, l'ATP inhibe la migration des DCs de manière dose dépendante (Schnurr et al., 2003). Cette signalisation inhibe également la maturation des DCs qui se traduit par une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD83 ainsi que de la sécrétion d'IL-12p70 (Berchtold et al., 1999; Wilkin et al., 2001). Des analyses pan génome montrent que ces DC différenciées en présence d'ATP ont un profil tolérogénique et expriment fortement plusieurs gènes codant pour des molécules immunosuppressives dont la thrombospondine-1 (TSP-1) et l'IDO (Marteau et al., 2005).



**Figure 3 : L'ATP a un rôle majoritairement pro-inflammatoire sur les cellules du système immunitaire.** L'ATP extracellulaire influence les fonctions de migration, de maturation, de cytotoxicité ou encore la différenciation de différents types cellulaires de l'immunité. (Adapté de Allard et al Immunol Rev 2017)

## ii. Action sur les cellules lymphoïdes

Les NK sont sensibles à l'ATP *via* l'activation de plusieurs récepteurs P2 (P2X1, -4, -7 et P2Y11) qu'ils expriment. Des données montrent notamment que le chimiotactisme CX3CL1-dépendant des NK ainsi que leurs capacités cytotoxiques sont inhibées par l'activation du récepteur P2Y11. Ceci suggère une possible régulation de l'activité des NK *via* l'engagement de ce récepteur (Gorini et al., 2010).

Les LTCD4 et LTCD8 activés sécrètent eux-mêmes un peu d'ATP qui a un effet autocrine activateur *via* P2X7 (Yip et al., 2009) mais également paracrine sur les lymphocytes environnants. Une exposition à de faibles doses d'ATP (10µM) stimule la prolifération de ces lymphocytes (Adinolfi et al., 2005) tandis qu'à forte concentration

(supérieure à 100 $\mu$ M), l'ATP inhibe leur motilité *via* l'axe P2X7-P2X4 (Aswad and Dennert, 2006; Wang et al., 2014). Des études chez l'Homme semblent notamment montrer que l'ATP *via* le récepteur P2X7 promeut la différenciation Th17 aux dépens des Treg en favorisant un contexte cytokinique prône à la différenciation des Th17 (Pandolfi et al., 2016; Younas et al., 2013). Les effets pro-inflammatoires de l'ATP synergisent notamment avec les signaux induits par les ligands de TLR sur les monocytes qui par leur sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23, favorisent une différenciation Th17 (Paustian et al., 2013).

Les Treg sont eux aussi sensibles à la présence d'ATP qui, à forte dose, peut induire leur apoptose *via* l'engagement du récepteur P2X7 (Aswad et al., 2005). L'activation de P2X7 pourrait également inhiber la génération et les fonctions régulatrices des Treg et induire leur conversion en Th17 (Schenk et al., 2011).

## **2. L'ADO EXTRACELLULAIRE : ORIGINE ET FONCTIONS IMMUNES**

### **a. Origine de l'Ado extracellulaire**

Si en condition physiologique, la présence d'Ado extracellulaire est faible dans les tissus et dans le plasma de donneur sain, elle est fortement augmentée dans les tissus inflammés, hypoxiques ou ischémiques (Blay et al., 1997; Gruber et al., 1989; Melani et al., 2003). Dans le cas des tumeurs, il a de plus été montré que le relargage accru d'Ado dans le milieu extracellulaire peut résulter d'un ensemble d'altérations génétiques dans la voie du métabolisme des purines qui surviennent lors de la progression tumorale (Tan et al., 2006). Dans le contexte tumoral, cette augmentation en Ado extracellulaire n'est pas seulement un phénomène passif subséquent à l'inflammation ou l'hypoxie dans ces tissus. Elle provient en majeure partie de la dégradation d'ATP ou d'AMP extracellulaire par deux ecto-enzymes membranaires clés, CD39 et CD73 (*cf.* **iii**), mais peut aussi être générée par le passage d'Ado intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ce transfert dépend de l'activité de deux types de transporteurs. D'une part les « equilibrative nucleotide transporter » (ENT) transportent l'Ado selon son gradient au travers de la membrane plasmique. Les ENTs comprennent 4 récepteurs (ENT1-4) présentant des affinités variables pour Ado, ENT1 étant celui avec la plus grande affinité et exprimé de manière ubiquitaire

(Boswell-Casteel and Hays, 2017). Dans des cellules épithéliales et endothéliales, il a été montré que la perte d'expression d'ENT1 induite par HIF-1 $\alpha$  dans des conditions d'hypoxie contribue à l'augmentation de l'Ado extracellulaire en limitant la récupération d'Ado par la cellule alors même que celle-ci est produite en grande quantité par les ecto-enzymes dans le milieu extracellulaire (Eltzschig et al., 2005). D'autre part, les « concentrative nucleotide transporter » (CNT, 1 à 3) sont capables de transporter l'Ado contre son gradient en utilisant le gradient d'ions sodium présent au niveau de la membrane plasmique comme source d'énergie. (Antonioli et al., 2013a; King et al., 2006). La concentration en Ado dans le milieu extracellulaire dépend également d'une enzyme extracellulaire membranaire ou circulante : l'adénosine déaminase (ADA) capable de dégrader l'Ado en Inosine (Ino), une molécule fonctionnellement inerte.

#### **b. Récepteurs spécifiques de l'Ado extracellulaire**

Tout comme l'ATP, l'Ado impacte la fonctionnalité de diverses cellules immunes et non immunes *via* une famille de quatre récepteurs GPCR spécifiques appelés Ado récepteurs (AdoR : A1, A2a, A2b et A3) ou récepteurs purinergiques P1, qui présentent des affinités variables pour l'Ado (Antonioli et al., 2013a). Les récepteurs A1 et A3 (couplés à des protéines G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub> ou G<sub>q</sub>) sont à l'origine de signaux activateurs pour les cellules immunes qui les expriment. A l'inverse, les récepteurs A2a et A2b (couplés à des protéines G<sub>s</sub> ou G<sub>q</sub>) activent des voies de signalisation conduisant à une inhibition de l'activation et de la prolifération des cellules cibles. Ces récepteurs n'agissent pas dans les mêmes conditions du microenvironnement, A2b présentant une affinité environ cent fois plus faible pour Ado par rapport à A2a (Bours et al., 2006). De plus, ces récepteurs ne sont pas exprimés par les mêmes cellules et l'engagement de ces récepteurs par la fixation d'Ado conduit à l'activation de différentes voies de signalisation. Le paragraphe ci-dessous résume l'ensemble des données décrivant l'expression de ces récepteurs sur les cellules immunes et les conséquences fonctionnelles que cela engendre. Ces données sont résumées sous forme de schéma dans la **Figure 4**.

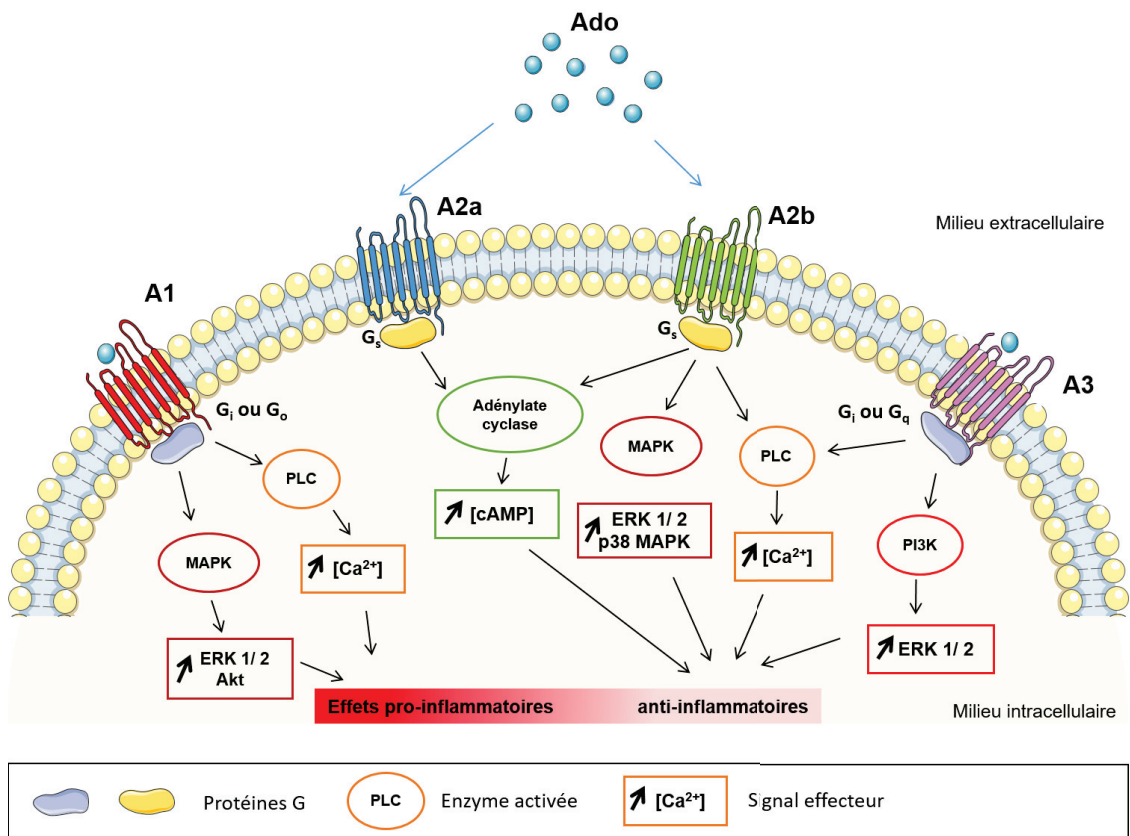
- **Distribution** : Les récepteurs A1 et A3 sont majoritairement exprimés par les neutrophiles, les monocytes, les M $\phi$  et les DC. Les récepteurs A2a et A2b, aussi présents sur ces cellules, sont par ailleurs fortement exprimés sur les lymphocytes T et



B activés et les NK. Le récepteur A2a est le principal médiateur d'une inhibition de l'activation des cellules immunitaires, notamment sur les LT sur lesquels il est exprimé à l'état basal tandis que l'expression de A2b nécessite leur activation.

- **Fonction :** Le rôle d'Ado dans la régulation du système immunitaire a été mis en évidence chez l'Homme et la souris avec le syndrome d'immunodéficience sévère (ADA-SCID) (Giblett et al., 1972). Ce syndrome est caractérisé par une déficience de l'enzyme ADA qui se traduit par une dégradation insuffisante d'Ado. L'Ado, non dégradée, s'accumule alors dans les tissus et agit sur plusieurs types cellulaires menant à une inhibition globale de la réponse immunitaire notamment caractérisée par une lymphopénie T et B sévère.

Sur le plan mécanistique, les récepteurs A2a et A2b sont considérés comme les deux principaux récepteurs impliqués dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire (Fredholm et al., 2007). La fixation d'Ado à ses récepteurs A2a ou A2b entraîne une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire *via* l'activation de l'adénylate cyclase (AC). L'accumulation d'AMPc induit alors une boucle de rétrocontrôle négative *via* l'activation de la kinase PKA. Une fois activée, cette protéine kinase permet la phosphorylation activatrice du facteur de transcription CREB (cAMP-response Element Binding protein). La forme phosphorylée de CREB régule alors des programmes transcriptionnels impliqués dans l'inflammation et inhibe notamment la voie NF- $\kappa$ B et promeut la production d'IL-10 (Wen et al., 2010). L'engagement d'A2b active également les voies des « mitogen associated protein kinases » (MAPK) et de la phospholipase C (PLC) qui aboutissent aussi à une inhibition des fonctions immunitaires (Lapa et al., 2014). Les voies de la PLC et des MAPK sont également activées *via* la fixation d'Ado à son récepteur A1 mais induisent des signaux pro-inflammatoires. Le récepteur A3 quant à lui active les voies de la PLC et de la PI3 kinase entraînant des effets anti-inflammatoires.



**Figure 4 : L'Ado active différentes voies de signalisation en se fixant à ses AdoR.** Les signaux effecteurs qui en résultent induisent des effets pro- ou anti-inflammatoires. (Adapté de Lapa et al. Pharmacology and therapeutics 2014, Antonioli et al Nat Rev Cancer 2013)

### i. Action sur les cellules myéloïdes

#### o CPAg

L'Ado agit sur les CPAg mais son action est différente en fonction du stade de maturation de ces dernières. Sur les DC immatures qui expriment le récepteur A1, l'Ado permet le recrutement par chimiotactisme (Panther et al., 2003; Schnurr et al., 2004). Cependant, l'Ado induit une différenciation biaisée de ces DC. Il a en effet été montré dans un modèle murin que les DC différenciées en présence de concentrations physiologiques d'Ado (utilisation de NECA (forme non hydrolysable) de 10nM à 100µM, EC50= 12,9µM) acquièrent un phénotype aberrant notamment caractérisé par l'augmentation de production de VEGF, de TGF-β ou encore d'IL-10 (Novitskiy et al.,

2008). Ces DC présentent des capacités pro-angiogéniques et tolérogéniques plus importantes ainsi qu'un défaut de stimulation des LT allogéniques qui secrètent alors des quantités limitées d'IFN- $\gamma$ . Ce biais de différenciation est médié par la fixation d'Ado à son récepteur A2b. Ce phénotype est délétère, notamment dans le contexte tumoral où la présence de ces DC favorise un microenvironnement immunotolérant. Sur les DC matures, qui n'expriment plus A1 mais acquièrent l'expression d'A2a, la fixation d'Ado inhibe leur migration vers les ganglions lymphatiques (Hofer et al., 2003). Elle inhibe également la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire CXCL10 favorable au recrutement des LTCD8 cytotoxiques. Elles continuent toutefois de sécréter CCL17 qui permet le recrutement des Treg et des Th2, deux populations fortement CCR4+, favorisant ainsi un microenvironnement anti-inflammatoire (Panther et al., 2003).

#### ○ **Macrophages**

Les M $\phi$  sont également impactés par la présence d'Ado dans leur environnement direct. *Via* A2a, l'Ado induit la sécrétion d'IL-10 qui va en retour inhiber la sécrétion d'IL-12p70 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes et les M $\phi$  (Bouma et al., 1994; Link et al., 2000). En association avec des ligands des TLRs, l'Ado contribue à une activation alternative des M $\phi$  en sous type M2 (Csóka et al., 2012; Pinhal-Enfield et al., 2003). En présence d'Ado *via* A2a, les M $\phi$  humains produisent également plus de VEGFR-1 sous sa forme membranaire pro-angiogénique (Leonard et al., 2011). Cette étude a été réalisée dans le contexte d'une atteinte cardiaque où la stimulation de l'angiogenèse est bénéfique au patient. En contexte tumoral en revanche, l'acquisition de propriétés pro-angiogéniques par les M $\phi$  est de mauvais pronostic dans la progression de la pathologie.

#### ○ **Neutrophiles**

A faible concentration (de l'ordre de 10-20nM), l'Ado permet *via* sa fixation aux récepteurs A1 et A3 le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme et promeut leur fonction de phagocytose (Chen et al., 2006; Cronstein et al., 1990). A de plus fortes concentrations (de l'ordre du  $\mu$ M et plus), l'Ado se fixe à ses récepteurs A2a et A2b et inhibe la migration et les fonctions effectrices des neutrophiles (production de ROS, dégranulation) (Barletta et al., 2012).

L'Ado participe donc à la génération d'une réponse anti-inflammatoire en induisant le recrutement de DC immatures et l'activation alternative des DC matures ce qui

contribue à l'activation et au recrutement de LT anti-inflammatoires, promeut la différenciation des Mφ en sous-type M2 et inhibe les fonctions effectrices des neutrophiles à fortes doses. L'expression des A2R sur les cellules myéloïdes contribue ainsi à l'inhibition des cellules NK et des LT mais l'Ado peut également inhiber directement les fonctions de ces cellules lymphoïdes.

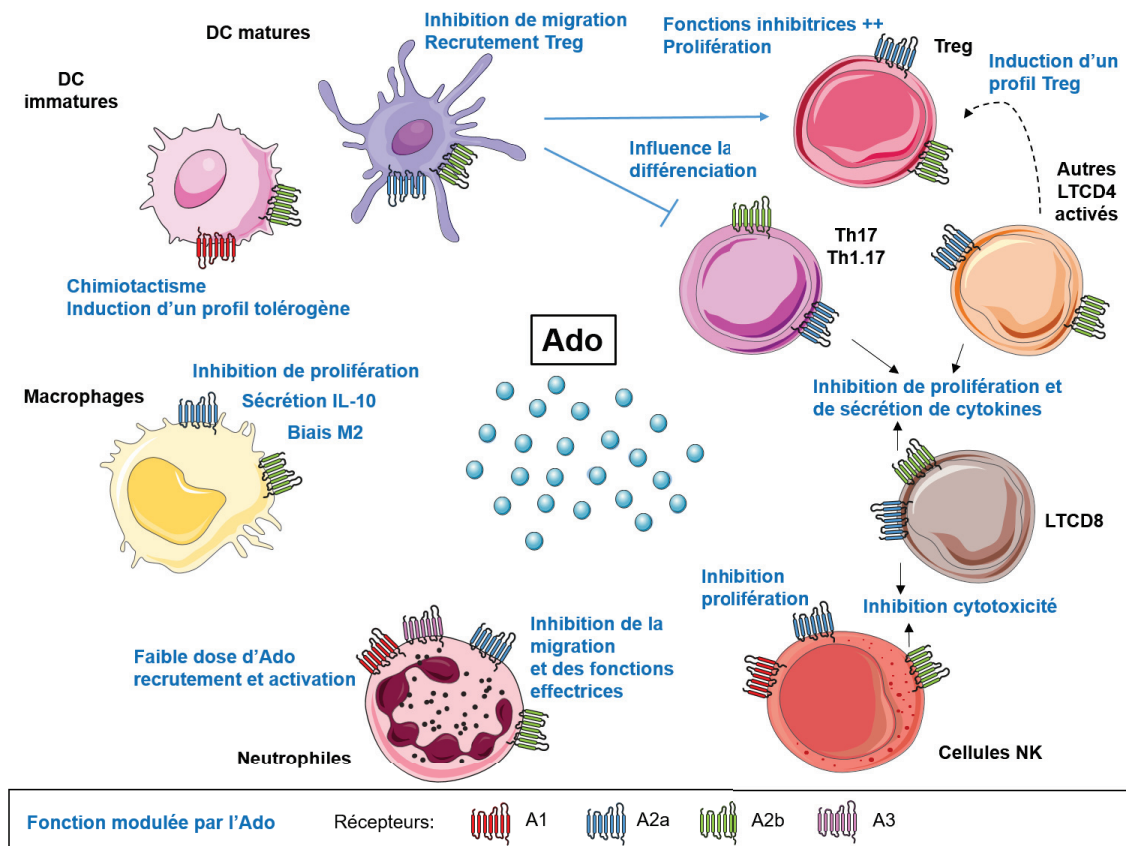
## **ii. Action sur les cellules lymphoïdes**

### **○ Lymphocytes T**

L'Ado est un puissant immunosuppresseur, capable d'agir sur plusieurs fonctions des LT. L'Ado inhibe la production de molécules d'adhésion comme l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ou ICAM-1 (CD54), nécessaires à leur activation (Johnston et al., 2005; MacKenzie et al., 2002). En agissant sur le phénotype des CPAg, l'Ado influence indirectement la différenciation des LTCD4 naïfs vers un profil tolérogène. Une élévation de la concentration en AMPc *via* A2a et A2b dans les LTCD4 naïfs présents dans un environnement riche en Ado biaise également leur différenciation vers un profil Treg (Anderson and Gonzalez-Rey, 2010). L'Ado inhibe également la transduction du signal TCR et diminue l'expression des molécules de co-stimulation CD2 et CD28. L'Ado contribue de ce fait à l'inhibition de l'expression de la chaîne CD25 du récepteur à l'IL-2, bloquant ainsi la prolifération et la synthèse de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) (Butler Jared J. et al., 2003; Lappas et al., 2005; Raskovalova et al., 2007). Cet effet de l'Ado est favorisé par l'augmentation de l'expression des récepteurs A2a et A2b sur les LT suite à l'activation TCR instaurant une boucle de rétrocontrôle négatif. De manière intéressante, une étude rapporte que seule la production d'IL-17A n'est pas impactée par la signalisation induite par Ado (Herrath et al., 2014). Les Treg expriment également les récepteurs A2a et A2b et la fixation d'Ado sur ces derniers stimulerait leur prolifération ainsi que leur expression de CTLA-4 et PD-1, renforçant ainsi leurs fonctions suppressives (Ehrentraut et al., 2012; Ohta et al., 2012). Chez la souris, l'Ado diminue aussi considérablement les fonctions cytotoxiques des LTCD8 (Linnemann et al., 2009). En contexte tumoral il a été récemment montré chez la souris que l'immuno inhibition médiée par Ado sur les LTCD8 est fortement dépendante de l'expression et de la fonctionnalité du récepteur A2a sur ces cellules (Kjaergaard et al., 2018). La délétion du gène codant pour cet AdoR ou l'utilisation d'un antagoniste spécifique de A2a (KW6002) induisent une levée de

l'inhibition qui se traduit par un rejet tumoral médié notamment par une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  par les LTCD8.

La **Figure 5** propose un bilan de l'action d'Ado connue à ce jour sur les populations immunes majeures.



**Figure 5 : Effet immunorégulateur de l'Ado sur les populations principales de cellules immunitaires chez l'Homme.** L'Ado inhibe de nombreuses fonctions immunitaires (prolifération, production de cytokines, cytotoxicité) principalement *via* sa fixation aux récepteurs A2a et A2b. (Adapté de Allard et al. Immunol Rev 2017)

#### ○ **Autres cellules lymphoïdes**

L'Ado module aussi négativement la prolifération et les fonctions cytotoxiques des NK *via* l'activation de la phosphokinase A I (PKA I) (Raskovalova et al., 2006). C'est également un inhibiteur puissant de la voie NF- $\kappa$ B, normalement activée en aval du

signal BCR dans les lymphocytes B (Minguet et al., 2005). Cette diminution NF- $\kappa$ B-dépendante de l'activation des lymphocytes B résulte d'un défaut de dégradation d'inhibiteurs de NF- $\kappa$ B non phosphorylés vont alors s'accumuler. L'expression du récepteur A3 par les lymphocytes B est également responsable de la régulation négative de ces cellules par une action autocrine de l'Ado (Saze et al., 2013).

Du fait de la multiplicité de ses récepteurs et de leur large spectre d'expression sur les cellules immunitaires, l'Ado a un effet immunosuppresseur étendu à l'ensemble de ces populations. Sa production et son élimination sont cependant finement régulées afin de prévenir ou de limiter des réponses exacerbées liées à une surabondance (tumeur) ou au contraire un défaut d'Ado (maladies auto-immunes) dans le microenvironnement.

### **3. LES ECTO-NUCLEOTIDASES CD39 ET CD73, DES « INTERRUPTEURS MOLECULAIRES » IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'INFLAMMATION**

La cascade de déphosphorylation de l'ATP extracellulaire en Ado fait intervenir quatre familles d'ecto-enzymes (Bours et al., 2006) :

- Les ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase). Chez l'Homme il en existe huit (E-NTPD1 à 8), E-NTPD1 étant CD39. Tout comme les autres membres de cette famille, CD39 est capable de dégrader l'ATP et l'ADP en AMP. Il est à noter que l'AMP peut également être générée en extracellulaire de manière CD39-indépendante *via* la dégradation de NAD<sup>+</sup> extracellulaire en ADP-ribosyl par CD38.
- Les ecto-nucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPP1 à 3) qui catalysent l'hydrolyse d'AMPc en AMP, ATP en AMP ou ADP en AMP. E-NPP1 est la molécule CD203a qui dégrade l'ADP-ribosyl, produit par CD38, en AMP.
- Les phosphatases alcalines, une famille d'ecto-phosphomono-estérases non-spécifiques qui catalysent la dégradation des nucléotides tri- di- et mono-phosphate.
- L'ecto-nucléotidase CD73 (ou 5' ecto-nucléotidase, 5'-NT), qui constitue le dernier maillon de la cascade de dégradation métabolique menant, en catalysant l'hydrolyse d'AMP, à la production d'Ado immunosuppressive.

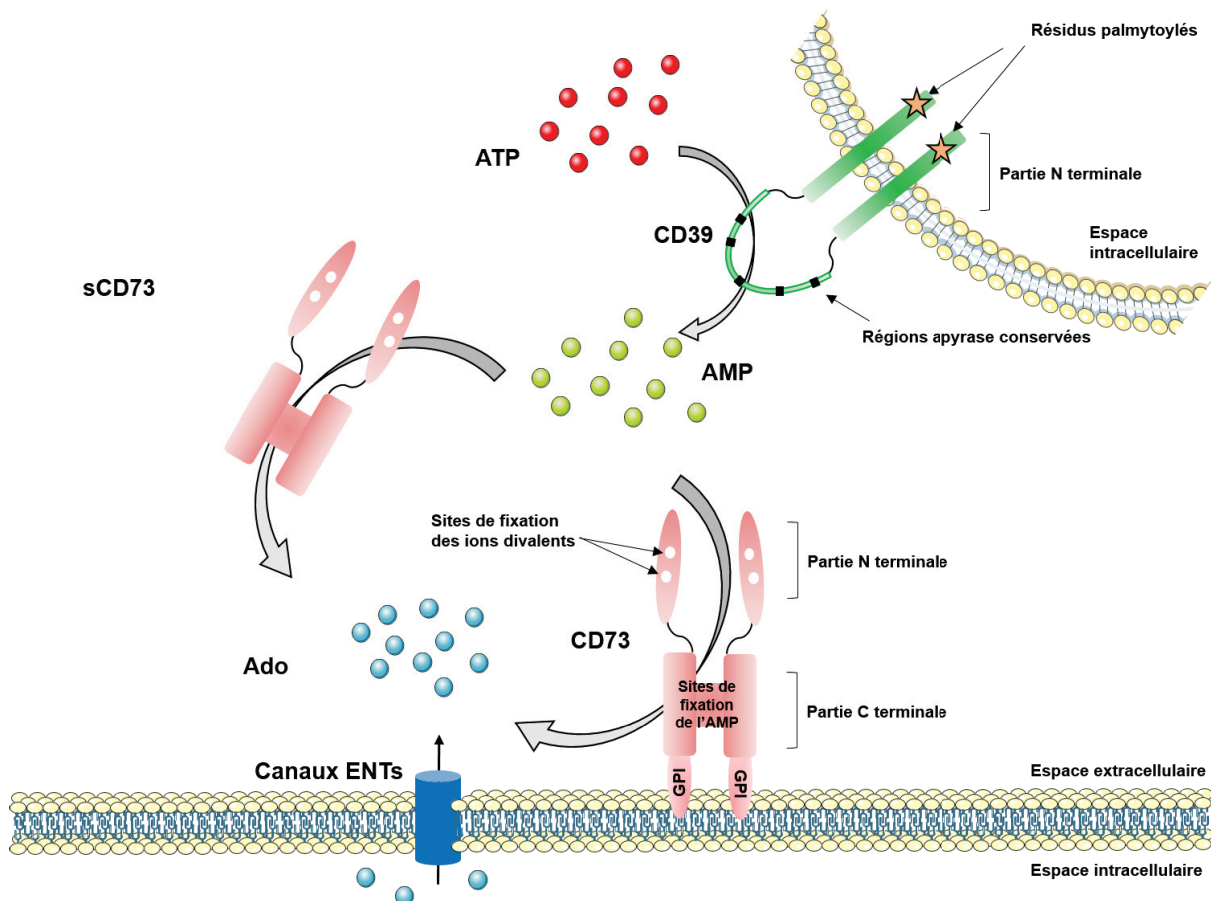
Le pool d'Ado extracellulaire produit par CD73 est limité par l'action d'ADA qui convertit de manière irréversible Ado en Ino, qui ne se fixe pas aux AdoR. ADA peut se trouver sous forme soluble ou associée à la membrane plasmique des cellules *via* la dipeptidyl peptidase IV ou CD26 (Kameoka et al., 1993). ADA est fortement exprimée par les cellules immunitaires activées et, de manière intéressante, elle est également abondamment présente dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT), notamment au niveau des plaques de Peyer, des îlots lymphoïdes localisés au contact de la muqueuse intestinale. Ces îlots jouent un rôle central dans la mise en place d'une réponse immunitaire dans l'intestin et dans la tolérance aux pathogènes commensaux, tout en assurant une homéostasie des muqueuses. Le phénotype ADA-SCID, notamment caractérisé par une atrophie des plaques de Peyer et un métabolisme des purines anormal au niveau du tube digestif, semble appuyer cette notion selon laquelle un excès d'Ado au niveau du tube digestif entraîne une lymphopénie majeure (Xu and Kellems, 2000).

Je détaillerai ci-après la cascade de dégradation impliquant les ecto-enzymes CD39 et CD73, acteurs principaux conduisant à la production d'Ado dans le contexte immunitaire en m'attardant sur la structure de ces molécules, leur expression dans le système immunitaire et ce qui est connu de leur régulation. La **Figure 6** (partie a.) illustre cette cascade et reprend des détails structuraux et fonctionnels des deux molécules impliquées. La **Figure 7** (partie b.) quant à elle résume la répartition d'expression de CD39 et CD73 parmi les cellules du système immunitaire chez l'Homme.

### **a. Organisation moléculaire**

CD39 est une molécule de 58kDa environ, codée par le gène *ENTPDI* situé sur le chromosome 10 chez l'Homme. La protéine comporte cinq domaines hautement conservés correspondant aux « apyrase conserved region » (ACR) et impliqués dans la formation du site actif de la molécule qui catalyse la phospho hydrolyse de ses substrats ATP et, dans une moindre mesure ADP, en AMP. Cette activité apyrase est dépendante de  $Ca^{2+}$  et de  $Mg^{2+}$ . Des glycosylations spécifiques de la protéine sont également nécessaires à sa fonction catalytique. CD39 est fixée à la membrane *via* deux segments transmembranaires, importants pour son activité catalytique et la spécificité de

substrat de l'enzyme. Dans sa partie N-terminale intracellulaire, des résidus palmitoylés assurent un ancrage de la molécule au niveau des rafts lipidiques dans la membrane plasmique (Allard et al., 2017; Antonioli et al., 2013a). CD39 existe également sous forme soluble contribuant à la dégradation d'ADP (Yegutkin et al., 2012) et sous forme circulante associée à des microvésicules dans le plasma humain (Jiang et al., 2014).



**Figure 6 : Production d'Ado extracellulaire à partir d'ATP extracellulaire via l'action combinée des ecto-nucléotidases CD39 et CD73.** CD73 peut également se trouver sous forme soluble active. Des canaux transmembranaires (ENT) peuvent aussi effluer de l'Ado intracellulaire dans le milieu extracellulaire. (Adapté de Antonioli *et al*, Trends in cancer 2016)

Le gène *NT5E*, qui code pour CD73, est porté, chez l'Homme, par le chromosome 6. La forme mature de la protéine est glycosylée et rattachée à la membrane par une ancre GPI située en position C-terminale. Sur le plan structural, c'est un homodimère



composé de deux chaînes identiques de 70kDa associées par des liaisons non-covalentes au niveau de leurs régions C-terminales. Sa fonction est l'hydrolyse de l'AMP en Ado.

Le site actif d'hydrolyse de l'AMP est localisé à l'interface des deux sous-unités. Une séquence peptidique spécifique située au niveau de la région N-terminale de la protéine assure la fixation de deux ions catalytiques ( $Zn^{2+}$  majoritairement) nécessaires à l'activité de l'enzyme. L'extrémité C-terminale, quant à elle, forme la poche dans laquelle se fixe l'AMP (Allard et al., 2017; Antonioli et al., 2013a, 2016). CD73 existe sous forme membranaire ou sous forme soluble (sCD73), toutes deux fonctionnelles (Heuts et al., 2012) qui résulte du clivage de la forme membranaire par des phospholipases spécifiques du phosphatidylinositol au niveau de l'ancre GPI. Elle peut circuler dans le flux sanguin ou d'autres fluides corporels. Elle peut être dosée et son taux sérique a récemment été identifié comme un potentiel biomarqueur prédictif de réponse au traitement puisqu'il a été corrélé à un risque accru de décès chez les patients atteints de mélanome traités par immunothérapie (Morello et al., 2017).

## **b. Expression sur les cellules du système immunitaire**

Chez l'Homme, dans le sang périphérique de donneurs sains, CD39 est constitutivement exprimé par plus de 90% des lymphocytes B et des monocytes, 20 à 30% des LTCD4 (incluant des LCTD4 mémoires effecteurs et des Treg), moins de 5% des LTCD8 et 2 à 5% des NK. CD73 est en revanche exprimé par 80% des lymphocytes B, 50% des LTCD8 avec une expression qui dépend de leur stade de différenciation, 10% des LTCD4, avec une expression controversée sur les Treg détaillée ci-après, et 2 à 5% des NK (Allard et al., 2017).

### **i. Les cellules myéloïdes**

#### **o Macrophages et monocytes**

CD39 a initialement été décrit comme un marqueur des lymphocytes B activés (Maliszewski et al., 1994). Il a cependant été établi depuis que cette E-NTPDase est exprimée par de nombreuses autres populations de cellules immunes, notamment par les monocytes circulants qui, en revanche, n'expriment pas CD73 chez les donneurs

sains. Les M $\phi$  murins et humains présentent, eux, une expression constitutive de CD39 à des niveaux variables. Ils peuvent co-exprimer CD73 chez la souris. Chez l'Homme en revanche, cette co-expression n'est observée que sur une sous-population de M $\phi$  M1 (Eichin et al., 2015; Hamidzadeh and Mosser, 2016). Des modèles murins ont permis d'établir que CD39 contribue à la régulation des M $\phi$  à plusieurs niveaux. Il participe notamment à la régulation de leur activation en favorisant la dégradation de l'ATP, ce qui limite l'activité pro inflammatoire des M $\phi$  (Cohen et al., 2013). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de CD39 (POM-1) ou l'analyse de souris KO pour CD39 (*Entpd1*<sup>-/-</sup>) montre également une sensibilité accrue des M $\phi$  à de très faibles concentrations de ligands de TLR-4 (LPS), ce qui se traduit par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$ ) mais qui rend les M $\phi$  également plus sensibles à la mort cellulaire (Cohen et al., 2013; Lévesque et al., 2010). Le niveau d'expression de CD39 sur les M $\phi$  est aussi influencé par la différenciation de ces cellules. En effet, chez la souris, les M $\phi$  de type M2 expriment plus fortement CD73 et CD39 que les M $\phi$  M1. Cette différence est associée à une capacité accrue des M $\phi$  M2 à dégrader l'ATP en Ado (Zanin et al., 2012). Il en est de même chez l'Homme où les M $\phi$  M2 présentent une plus forte expression de CD39 comparés aux M $\phi$  M1. Toutefois l'absence de CD73 sur ces M $\phi$  M2 ne permet pas la génération d'Ado (d'Almeida et al., 2016).

#### ○ **Neutrophiles**

Les neutrophiles humains expriment CD39. Contrairement aux neutrophiles murins, l'expression de CD73 par les neutrophiles humains semble faible. Ils peuvent cependant contribuer à la dégradation d'ATP en AMP *via* CD39 qui peut à son tour être dégradé en Ado grâce à la coopération avec une autre population cellulaire exprimant CD73 (Eltzschig et al., 2008). L'Ado peut ainsi avoir une action autocrine sur les neutrophiles et également paracrine sur d'autres cellules environnantes. De manière intéressante, la production d'Ado par les neutrophiles est augmentée avec leur niveau d'activation (Barletta et al., 2012).

#### ○ **Cellules dendritiques**

Les DC expriment également CD39 mais des différences existent en fonction du sous-type considéré. Ainsi, les cellules de Langerhans, DC localisées dans l'épiderme expriment CD39 (Santegoets et al., 2008). Des données de l'équipe montrent également que les MoDC expriment de forts niveaux de CD39 ce qui suggère leur

implication dans la dégradation d'ATP extracellulaire. L'expression de CD39 par les DC myéloïdes influe sur la modulation de la réponse T (Berchtold et al., 1999) et est notamment importante pour limiter l'inflammation dans des modèles de lésions d'ischémie-reperfusion dans le foie chez la souris (Yoshida et al., 2013). En contexte tumoral, le blocage de l'activité enzymatique de CD39 induit une augmentation de la concentration en ATP extracellulaire permettant le recrutement de DC et leur maturation ce qui augmente la mort immunogène au site tumoral (Ma et al., 2013b). Par ailleurs, des travaux récents chez la souris montrent un rôle de CD39 dans l'immuno-modulation des DC par l'IL-27. En effet, l'IL-27, en augmentant l'expression de CD39 sur les DC, promeut une tolérance en inhibant la différenciation des LTCD4 en Th1 et Th17, ce qui diminue les signes cliniques dans un modèle d'EAE (Mascanfroni et al., 2013).

## **ii. Les cellules lymphoïdes**

### **○ Lymphocytes B**

Tous les LB humains expriment CD39 et la grande majorité (80%) co-exprime CD73. La production d'Ado par les lymphocytes B participe notamment à la régulation des lymphocytes T (Saze et al., 2013). Une population de lymphocytes B CD39<sup>hi</sup> chez l'Homme a de plus été identifiée comme une population de Breg CD19<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup> qui possède une forte capacité proliférative et induit un microenvironnement suppresseur *via* la génération d'Ado et d'IL-10 (Figueiró et al., 2016). Il a également été montré que des LB activés *in vitro* perdent l'expression de CD73 lorsqu'ils prolifèrent (Saze et al., 2013). C'est le cas des plasmocytes, des LB hautement différenciés et spécialisés dans la production de grande quantité d'immunoglobulines. Il est important de noter que chez la souris, la plupart des LB du sang périphérique ou des tissus n'expriment pas CD73. Cette expression est restreinte à des sous populations de LB spécifiques, notamment les LB du centre germinatif et les LB ayant finalisé la commutation isotypique de classe dont les fonctions ne sont pas encore toutes élucidées (Schena et al., 2013).

### **○ Cellules NK**

Chez l'Homme comme chez la souris, les NK circulants expriment peu ou pas CD39 et CD73 sauf dans des contextes pathologiques précis. Il a ainsi été montré que les NK des tumeurs peuvent acquérir l'expression de CD73 contribuant ainsi à l'inhibition de

la réponse anti-tumorale (Buisseret et al., 2015; Stagg et al., 2012). L'expression de CD73 peut donc être induite sur les NK par des facteurs environnementaux de la niche tumorale, notamment en présence de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) (Chatterjee et al., 2014a).

- **Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Quel que soit leur niveau de différenciation, les LTCD8 expriment peu CD39. Il est cependant acquis sur les LTCD8 activés. L'ecto-nucléotidase CD73, elle, est fortement exprimée par les LTCD8 naïfs et son expression diminue au cours de leur différenciation en populations mémoires terminales (Bono et al., 2015). L'expression de CD39 par des LTCD8 régulateurs FoxP3<sup>neg</sup>IL10<sup>+</sup>, renforce également leurs fonctions suppressives et est associée à l'établissement d'une tolérance périphérique (Noble et al., 2016). Chez la souris, il a par ailleurs été montré que des LTCD8 CD39<sup>+</sup> et LTCD8 CD39<sup>neg</sup> expriment des niveaux semblables de CD73 avec cependant une expression plus forte d'Ado par les LTCD8 CD39<sup>+</sup>, les protégeant contre l'action autocrine d'Ado. Les LTCD8 CD39<sup>+</sup> activés régulent ainsi négativement la production d'IFN- $\gamma$  par les LTCD8 CD39<sup>neg</sup> *via* la fixation d'Ado à son récepteur A2a (Bai et al., 2015). D'autres études récentes suggèrent que CD39 identifie une population de LTCD8 « épuisés » dans certains contextes pathologiques, notamment dans le contexte infectieux (Gupta et al., 2015) ou tumoral (Canale et al., 2018). Dans certaines tumeurs solides humaines, l'évaluation de l'expression de CD39 sur les LTCD8 semble de plus corrélérer avec la présence de clones de LTCD8 intra-tumoraux spécifiques d'antigènes tumoraux et pourrait donc être un marqueur intéressant pour quantifier la présence de LTCD8 spécifiques d'antigènes tumoraux (Simoni et al., 2018). Alors que CD39 augmente sur des LTCD8 « épuisés » de patients, la proportion de LTCD8 CD73<sup>+</sup> est, elle, réduite dans le sang des patients infectés par HIV notamment (Tóth et al., 2013). Chez la souris, il a par ailleurs été récemment montré que l'Ado extracellulaire agit également de façon autocrine pour stabiliser la population de Tc17, un sous type de LTCD8 producteurs d'IL-17 et ayant de faibles capacités cytotoxiques. L'Ado produit par ces Tc17 maintient la voie Wnt active *via* la signalisation des A2R, ce qui favorise l'expression des facteurs de transcription tels que TCF-7 et LEF-1, promouvant un état caractéristique des « cellules souches » de ces Tc17. L'Ado limite en revanche la production de molécules effectrices de type Tc1 (GzB et IFN- $\gamma$ ) (Flores- Santibáñez et al., 2015).

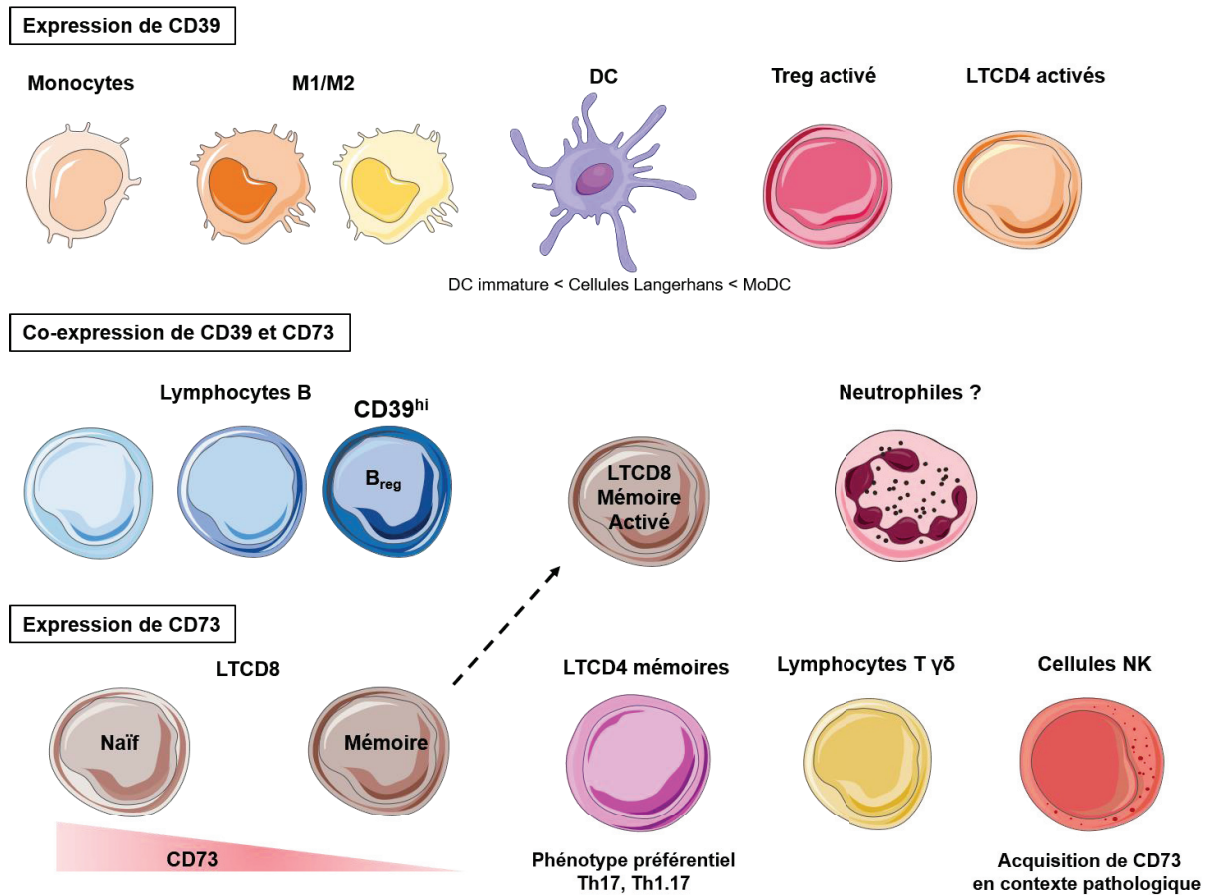
- **Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

**Treg :** Parmi les LTCD4, CD39 est particulièrement présent sur les Treg à la fois chez la souris et chez l'Homme (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). Chez la souris, CD39 est exprimé par tous les Treg mais ces derniers doivent être activés pour que l'ecto-enzyme soit fonctionnelle. CD39 est de plus co-exprimé avec CD73 et joue un rôle central dans l'immunosuppression. Des Treg CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> sont en effet capables d'améliorer les signes cliniques de colite induite par un transfert de LTCD4 naïfs, illustrant l'importance de l'expression de ces ecto-enzymes dans les fonctions suppressives des Treg (Gibson et al., 2015).

Chez l'Homme en revanche, l'expression de CD73 par les Treg, et donc leur capacité à produire de l'Ado de manière autonome, est très controversée. Certaines études ont suggéré la co-expression de CD39 et CD73 sur les Treg humains (Alam et al., 2009; Mandapathil et al., 2010) alors que d'autres montrent que CD39 est exprimé par les Treg activés mais qu'ils ne co-expriment pas CD73 (Dwyer et al., 2010). La fréquence de Treg CD39<sup>+</sup> est augmentée chez des patients infectés par HIV ou HBV (Nikolova et al., 2011; Tang et al., 2012). Dans des pathologies auto-immunes telles que la PR ou la maladie de Crohn, les Treg CD39<sup>+</sup> sont présents, parfois même en grand nombre notamment au niveau des sites d'inflammation, mais leurs fonctions suppressives sont altérées (Borsellino et al., 2007; Gibson et al., 2015; Rissiek et al., 2015). Dans ces contextes, l'expression de CD39 par les Treg peut même servir de marqueur pronostique. Ainsi, les patients souffrant de PR résistante au traitement par Méthotrexate (MTX) présentent une faible fréquence de Treg CD39<sup>+</sup> contrairement aux patients répondeurs (Peres et al., 2015).

**Teffs :** CD39 est exprimé par des LTCD4 mémoires non régulateurs (Zhou et al., 2009). Les Teffs CD39<sup>+</sup> expriment fortement des gènes caractéristiques de populations Th1 et Th17. Chez l'Homme, une population de LTCD4 mémoires non régulateurs exprimant CD39 et produisant des cytokines pro-inflammatoires de type Th17 a également été décrite (Moncrieffe et al., 2010). CD73 est quant à lui exprimé par une faible proportion des LTCD4 circulants chez les sujets sains. Cette proportion varie dans différents contextes pathologiques. Elle est notamment augmentée dans le sang périphérique de patients atteints de la maladie de Crohn par rapport à des donneurs sains et la population de LTCD4 CD73<sup>+</sup> identifiée est enrichie en LTCD4 mémoires de type Th17 (Doherty et al., 2012) (voir paragraphe **Focus sur les Th17**). D'autres

études montrent la même tendance chez des patients atteints de PR ou d'arthrite idiopathique juvénile (AIJ). En revanche, la fréquence de cette même population est diminuée au niveau du liquide synovial des articulations inflammées par rapport au sang périphérique chez les patients (Botta Gordon- Smith et al., 2015; Herrath et al., 2014).



**Figure 7 : Expression des ecto-nucléotidases CD39 et CD73 sur les cellules immunes chez l'Homme.** L'expression de ces molécules est dynamique et notamment modulée par le statut d'activation des cellules (LT) ou de leur localisation (DCs).

**Focus sur les Th17.** Chez des patientes atteintes de cancer du sein, l'accumulation de Th17 exprimant CD39 et CD73 est de mauvais pronostic car notamment associé à un faible recrutement de LTCD8 au site tumoral (Thibaudin et al., 2015). Il semble que la différence entre des Th17 pro et anti-tumoraux résulte en partie de la présence ou de l'absence de TGF-β1 respectivement lors de la différenciation de ces cellules qui

induit notamment l'expression des ecto-enzymes (Chatterjee et al., 2014b). Chez la souris, des Th17 différenciés en présence d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et de TGF- $\beta$ 1 co-expriment pour la plupart CD39 et CD73. A l'inverse, si TGF- $\beta$ 1 est remplacé par TGF- $\beta$ 3, et que les cellules sont réactivées en présence d'IL-23, les Th17 générés expriment peu ces ecto-nucléotidases (Fernández et al., 2016). Chez l'Homme, des données récentes suggèrent que les Th17 suppresseurs émergent de la différenciation de Treg placés dans un environnement pro-Th17 (Longhi et al., 2014). Ces Th17 suppresseurs sont détectés dans le sang de donneurs sains et leur fréquence est diminuée chez des patients atteints de maladie de Crohn. A l'inverse, une étude chez des patients atteints de maladie de Crohn et ayant pour objectif de caractériser les LTCD4 humains exprimant CD73, montre qu'ils sont majoritairement de phénotype Th17 mais ne présentent pas de capacités suppressives accrues (Doherty et al., 2012). L'ensemble de ces données suggère donc une association de l'expression de CD73 avec un phénotype Th17 parmi les Teff chez l'Homme ce qui diffère fortement des données obtenues chez la souris.

### **c. Expression des ecto-enzymes et des AdoR sur les cellules tumorales et impact fonctionnel sur le développement tumoral**

L'expression de CD39 et de CD73 n'est pas restreinte aux cellules immunitaires. Les cellules tumorales peuvent également exprimer CD39 (Bastid et al., 2015; Cai et al., 2015), CD73 (Leclerc et al., 2016; Loi et al., 2013; Nevedomskaya et al., 2016; Turcotte et al., 2015) ou les deux (Häusler et al., 2011) dans de nombreux types de tumeurs solides. La présence de ces molécules est, la plupart du temps, associée à un mauvais pronostic pour les patients du fait d'une part de l'action d'Ado sur l'ensemble des acteurs du système immunitaire et d'autre part de l'impact d'Ado sur les cellules tumorales elles-mêmes. En effet, en plus d'exprimer ces ecto-enzymes leur permettant de contribuer activement à la production d'Ado immunosuppressive, les cellules tumorales expriment les AdoR dont certains permettent d'activer des voies de signalisation favorables à leur survie et leur prolifération (*cf.* **Figure 4**). Ainsi, l'expression de A1R est augmentée sur des cellules tumorales de cancer du sein en comparaison à des cellules mammaires normales et l'extinction de l'expression de cet AdoR *via* l'utilisation d'ARN interférants favorise l'arrêt du cycle cellulaire et induit

l'apoptose (Mirza et al., 2005). La fixation d'Ado au récepteur A2a exprimé par des lignées tumorales de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB231) stimule également leur prolifération et leur migration (Etique et al., 2009; Zhou et al., 2015) alors qu'il induit l'apoptose caspases-dépendante sur certaines lignées tumorales de mélanome ou de colon (Merighi et al., 2001; Yasuda et al., 2009). L'expression de A3R est également trouvée augmentée dans plusieurs types de tissus tumoraux par rapport aux tissus sains adjacents (Gessi et al., 2004; Madi et al., 2004). Cependant, la fixation d'Ado au récepteur A3 n'a pas forcément un rôle pro-tumoral car elle altère également la prolifération des cellules tumorales en favorisant un arrêt du cycle cellulaire (Panjehpour and Karami-Tehrani, 2004, 2007). Ceci a donné lieu à de nombreuses études visant à déterminer l'intérêt de l'utilisation d'agonistes de A3R dans l'arsenal thérapeutique anti-tumoral.

L'Ado, en fonction du profil génétique des cellules tumorales et du type de récepteur à l'Ado engagé, peut avoir un impact pro-tumoral ou anti-tumoral. Les résultats contradictoires observés peuvent s'expliquer par la co-expression de plusieurs AdoR dont les effets synergisent ou s'antagonisent. Les études considérées utilisent également des concentrations variables d'Ado qui peuvent aussi expliquer en partie ces contradictions.

Par ailleurs, CD73 est aussi exprimé sur certaines cellules épithéliales normales de l'intestin (Strohmeier et al., 1997), du rein ou encore du cerveau (Colgan et al., 2006) mais également sur les cellules endothéliales et les cellules stromales telles que les CSM, et les fibroblastes (Airas et al., 1997; Niemelä et al., 2004). Pour l'ensemble de ces types cellulaires, CD73 joue des rôles importants qui peuvent être indépendants de son activité enzymatique, en particulier sur la modulation de la perméabilité membranaire (Antonioli et al., 2013b; Colgan et al., 2006). Il est donc clair que la production d'Ado à partir d'ATP extracellulaire n'est pas limitée uniquement aux cellules immunitaires, mais que CD73 peut également être impliquée dans des processus cellulaires complexes indépendants de sa fonction enzymatique.



#### **4. REGULATION DE L'EXPRESSION DES ECTO-ENZYMES SUR LES CELLULES IMMUNES**

Du fait de leur rôle important dans l'immunosuppression, il est indispensable que l'expression de CD39 et CD73 soit finement régulée pour assurer une activation appropriée de la réponse immune face à une agression.

##### **a. Régulation de CD39**

La régulation de l'expression de cette ecto-enzyme dans les cellules immunes a été largement étudiée chez la souris. Il a notamment été montré que l'expression de CD39 peut être induite ou accentuée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 sur des Th17 (Chalmin et al., 2012) ou l'IL-27 sur des DC (Mascanfroni et al., 2013). Le stress oxydatif (Fausther et al., 2010) ou l'hypoxie (Eltzschig et al., 2009) sont également des altérations de l'environnement pouvant induire l'expression de CD39. Dans ce dernier cas, l'expression de CD39 est induite par l'activité d'un facteur de transcription, SP1, qui est surexprimé en condition d'hypoxie. L'augmentation de la concentration en AMPc qui résulte de la voie de signalisation en aval des A2R régule aussi positivement la transcription du gène *ENTPDI* via l'activation du complexe AMPc/CREB (Liao et al., 2010). A l'inverse, le TGF- $\beta$  qui induit l'expression du facteur de transcription GFI-1, inhibe l'expression de CD39 par les Th17 murins (Chalmin et al., 2012). Chez l'Homme, une étude montre une inhibition d'expression de CD39 sur des cellules HUVEC par l'IL-1 $\beta$ . Cette même cytokine augmente l'expression de CD39 sur une population de LTCD4 (identifiée par la combinaison de marqueurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et proposée comme Treg) après 12h de stimulation *in vitro* de cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) (Sutton et al., 2013), suggérant que CD39 est régulé différemment selon le type cellulaire considéré. La vitamine D (1 $\alpha$ -2,5 dihydroxyvitamine D3), dont un déficit a été associé avec plusieurs désordres auto-immuns, est également un activateur de l'expression de CD39. Elle joue notamment un rôle protecteur dans l'asthme en diminuant la production d'IL-17A et d'IL-22 par les Th17 via l'induction de l'expression de CD39 (Nanzer et al., 2013). L'étude ne permet cependant pas de déterminer si cette diminution de production de cytokines pro-inflammatoires est uniquement due à une diminution de la concentration extracellulaire en ATP pro-inflammatoire (dégradé par CD39) ou si la cascade de

dégradation de l'ATP est complète et permet une action d'Ado sur ses récepteurs (A2a, A2b) pour inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires.

L'ensemble de ces données montrent une régulation au niveau transcriptionnel du gène *ENTPDI* codant pour CD39. Il a également été montré que CD39 n'a pas d'activité apyrase tant qu'elle n'a pas été transportée à la membrane et qu'elle n'est pas correctement N-glycosylée (Zhong et al., 2001).

## **b. Régulation de CD73**

En ce qui concerne la régulation de l'expression de CD73, des travaux récents ont montré chez la souris que le TGF- $\beta$ 1 (Flores- Santibáñez et al., 2015; Regateiro et al., 2011) mais aussi l'acide rétinoïque (Francois et al., 2015) peuvent augmenter l'expression de CD73, sur les LT mais également d'autres cellules immunes. Compte tenu de la place centrale occupée par le TGF- $\beta$  dans la balance de différenciation Treg/Th17, deux populations qui expriment CD73 chez la souris, il est logique d'établir un rôle régulateur de ce dernier dans l'expression de CD73. Chez la souris, l'hypoxie joue aussi un rôle dans la régulation de l'expression de CD73 sur les cellules épithéliales intestinales (Synnestvedt et al., 2002).

Chez l'Homme en revanche, il existe à ce jour peu d'informations sur la régulation de CD73 dans les cellules immunes. Je propose donc de présenter des données connues sur les cellules immunitaires mais également sur d'autres types cellulaires qui peuvent fournir des informations supplémentaires sur la régulation de CD73 et donner des pistes pour étudier plus précisément cette régulation dans les cellules immunitaires.

Il a pu être montré que l'expression de CD73 est régulée négativement avec l'activation des LB *via* leur BCR (Saze et al., 2013), indiquant une expression dynamique de CD73 à la surface des LB. Cette même dynamique est observée dans les LTCD8 différenciés qui ont un profil plus activé et expriment de manière plus restreinte CD73 par rapport à des LTCD8 naïfs (Bono et al., 2015). Un rôle du TNF- $\alpha$  a également été proposé par plusieurs équipes mais il semble que cette cytokine ait un effet différent en fonction du type cellulaire considéré. En effet le TNF- $\alpha$  augmente l'expression de CD73 sur les LTCD4 de patients atteints de la maladie de Crohn (Doherty et al., 2012). Cette augmentation d'expression est inhibée par le traitement des patients avec un anticorps

anti-TNF- $\alpha$  bloquant (Infliximab). Au contraire, le traitement de cellules endothéliales humaines avec du TNF- $\alpha$  diminue l'expression de CD73 et son activité enzymatique (Kalsi et al., 2002). L'expression de CD73, modulée pendant la différenciation des LT, semble influencée positivement par le TGF- $\beta$ 1 alors que l'ajout d'IL-1 $\beta$  diminue l'expression de CD73 sur des Th17 différenciés *in vitro* (Chatterjee et al., 2014b). L'IL-21 semble également capable d'induire l'expression de CD73 sur des lymphocytes T $\gamma\delta$  (Barjon et al., 2017). La vitamine D, qui module l'expression de CD39 (*cf. a. Régulation de CD39*) augmente également l'expression de CD73 sur des LTCD4 FoxP3<sup>neg</sup> circulants. Cette augmentation d'expression semble en partie dépendante de la signalisation TGF- $\beta$  puisque la neutralisation de cette molécule diminue l'effet de la vitamine D sur l'expression de CD73 (Mann et al., 2015). Le traitement de cellules endothéliales avec des interférons de type-I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) permet d'augmenter l'expression de CD73 (Kiss et al., 2007; Niemelä et al., 2004) et de réduire la perméabilité membranaire dans les cas des syndromes de détresse respiratoire aigüe (Bellingan et al., 2014). L'hypoxie est également un facteur de régulation potentiel de l'expression de CD73 chez l'Homme. Une forte corrélation entre l'expression de HIF-1 $\alpha$  et de CD73 dans des tissus tumoraux humains a notamment été montrée, sans pour cela qu'un lien direct soit établi (Lu et al., 2013). Aucune donnée n'existe en revanche à ce jour sur le rôle de l'hypoxie dans l'expression de CD73 sur les cellules immunes chez l'Homme.

Une régulation épigénétique de l'expression de CD73 a également été démontrée. Des données de PCR méthylation-spécifique réalisées sur des lignées tumorales humaines montrent en effet une régulation de l'expression de *NT5E* *via* une méthylation de l'îlot CpG situé dans la région du promoteur du gène. Il a ainsi pu être établi que des lignées tumorales exprimant fortement CD73 sont largement déméthylées au niveau de l'îlot CpG de *NT5E* à l'inverse de lignées CD73<sup>neg</sup> dont le promoteur du gène *NT5E* est fortement méthylé. Du fait de l'impact négatif de l'expression de CD73 par les cellules tumorales, la méthylation de *NT5E* peut être considérée comme un facteur prédictif dans la survie des patients (Lo Nigro et al., 2012; Wang et al., 2012). En effet, une forte méthylation du promoteur du gène *NT5E* dans les cellules tumorales est un facteur pronostique favorable pour les patients et une réexpression de *NT5E* est associée à un phénotype plus agressif des cellules tumorales. De plus, dans le cancer du sein, il a été établi que le statut CD73 d'une tumeur peut être lié au sous type moléculaire auquel

elle appartient. Cela est dû à une modulation de la signalisation des œstrogènes *via* leur récepteur ER capable de réguler négativement l'expression de CD73. Par conséquent, des lignées de cancer du sein du sous type triple négatif expriment plus fréquemment CD73 que des lignées de cancer du sein de sous-type luminal (ER<sup>+</sup>) (Spychala et al., 2004).

La cascade de dégradation de l'ATP en Ado fait donc intervenir deux ecto-enzymes clés, CD39 et CD73, dont la distribution et la régulation influencent largement la réponse immunitaire en modulant la composition de l'environnement immunitaire et notamment la balance Th17/Treg, le type de réponse (à dominante pro-ou anti-inflammatoire) ainsi que la fonction des cellules immunitaires. L'action d'ATP et d'Ado repose sur l'expression des récepteurs spécifiques (P2R pour l'ATP, P1R pour l'Ado) dont l'expression et la distribution sont également centrales pour la régulation de la réponse immune.

Plusieurs des exemples cités plus haut mettent en évidence que cette cascade de régulation est rompue ou défaillante dans des contextes auto-immuns, notamment dans les pathologies articulaires comme la PR. Une partie de mes travaux de thèse s'étant articulée autour de l'étude des populations de LTCD4 exprimant CD39 et CD73, ecto-enzymes clés de cette cascade métabolique dans la PR et le rhumatisme psoriasique (RPso), je présenterai brièvement ces deux pathologies sur le plan clinique et biologique, et je ferai également un état des lieux de ce qui est connu du fonctionnement de cette cascade immunosuppressive dans ces pathologies.

### **III. INFLAMMATION MEDIÉE PAR LES LYMPHOCYTES T DANS LA PR ET LE RPso**

La PR et le RPso sont deux pathologies inflammatoires chroniques affectant les articulations et pouvant devenir fortement handicapantes et impacter l'espérance de vie des patients. Dans chacune de ces pathologies, des études menées depuis plusieurs dizaines d'années ont permis d'établir un rôle majeur des LT, et notamment des Th17.

#### **1. LA PR : ETIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE ET TRAITEMENT**

##### **a. Etiologie**

La PR est la plus fréquente des maladies systémiques inflammatoires affectant 0,5 à 1% de la population adulte dans le monde. C'est une maladie auto-immune multifactorielle et multigénique dont le traitement reste encore à ce jour un défi. Malgré les avancées considérables dans la compréhension de sa physiopathologie, son étiologie reste encore mal comprise. Il est aujourd'hui établi que c'est une maladie qui se développe en plusieurs stades et que des facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux influencent son évolution. Je propose d'aborder rapidement ces différents facteurs dans leur ordre d'intervention dans l'évolution de la maladie.

Le facteur génétique, représente le premier facteur de risque élevé de développer une PR. Il existe plusieurs dizaines de polymorphismes associés à la PR identifiés à ce jour. La susceptibilité génétique la plus fortement associée au développement d'une PR concerne les gènes codant pour certaines molécules HLA (human leukocyte antigen) de classe II (Deane et al., 2017). Le risque génétique le plus fort est en particulier associé à un groupe d'allèles du CMH de classe II qui codent pour des molécules de HLA très similaires dans leur conformation du sillon accueillant le peptide qu'elles présentent et qui est désigné sous le terme de « shared epitope » (SE) ou épitope partagé (Raychaudhuri et al., 2012a). Selon certaines études, les allèles codant pour le SE contribuent pour 40% au risque génétique de développer une PR.

A cela s'ajoute la contribution des facteurs environnementaux qui pourrait être plus importante qu'initialement envisagée. Ces facteurs environnementaux sont

responsables de modifications post-traductionnelles sur des protéines qui, chez des sujets génétiquement prédisposés, conduisent à une activation erratique du système immunitaire. Parmi eux, les polluants atmosphériques (dioxyde d'azote, poussières de silice) ainsi que les habitudes alimentaires ou encore l'exposition à certains pathogènes (*Porphyromonas gingivalis* et *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, responsables de périodontite chronique ou encore *Borrelia burgdorferi* responsable de la maladie de Lyme) sont particulièrement visés sans que des associations définitives entre l'exposition à ces facteurs et le développement de PR ne soient pour le moment établies (Alpizar-Rodríguez and Finckh, 2017). Il est en revanche certain que la consommation de tabac est un facteur de risque dans la PR. Le tabac est en effet un fort stimulateur de la citrullination des protéines et la génération d'anticorps anti-protéines citrullinées (cf. **paragraphe physiopathologie**) (Klareskog et al., 2006). Certains de ces facteurs pouvant, dans une certaine mesure, être modifiés, il est important de poursuivre leur étude afin de les prendre en compte dans la compréhension et la prévention de la PR.

Enfin, les facteurs hormonaux influencent également la susceptibilité à cette pathologie. Il y a en effet jusqu'à quatre fois plus de femmes que d'hommes atteints par la pathologie dans certaines tranches d'âge. Le facteur hormonal est cependant difficile à prendre en compte et à apprécier étant donné que les taux d'hormones sécrétés varient au cours de la vie. Néanmoins, il a pu être établi que le pic d'incidence de la pathologie coïncide avec la ménopause, phénomène physiologique qui s'accompagne d'une chute drastique du taux plasmatique des hormones féminines qui jouent un rôle protecteur dans la PR. On observe également un effet protecteur de la grossesse sur le développement de la pathologie mais une augmentation du risque de développer une PR dans les trois premiers mois post-partum (Alpizar-Rodríguez et al., 2017).

## **b. Physiopathologie**

Sur le plan physiopathologique, la PR est une maladie chronique inflammatoire caractérisée par la destruction du cartilage articulaire et une érosion osseuse qui sont accompagnées par la production locale de taux élevés de cytokines pro-inflammatoires. C'est une pathologie poly-articulaire symétrique qui touche en premier lieu les articulations diarthrodiales des mains et des pieds (Firestein, 2003). Ces symptômes

sont handicapants et diminuent la qualité de vie des patients. L'espérance de vie est également impactée du fait de nombreuses comorbidités pneumo-cardio-vasculaires associées à la pathologie, comme l'asthme ou l'athérosclérose (Dougados et al., 2013). Plusieurs phases sont décrites dans la progression de la maladie dans lesquelles les facteurs cités plus haut interviennent de manière séquentielle. Les phases précoces ou « pré-PR » regroupent la phase d'initiation de la réponse immunitaire et la phase d'amplification de cette réponse. Elles sont caractérisées par des stades asymptomatiques ou symptomatiques non-décrits comme PR classique. Enfin la phase effectrice de la réponse immunitaire et de l'inflammation constitue la phase finale de la PR établie (Paul et al., 2017). Elle se caractérise par une destruction tissulaire non réparée et une hyperplasie de la membrane synoviale des articulations atteintes avec un infiltrat immunitaire anormalement abondant. Cet infiltrat immunitaire est dominé par la présence de neutrophiles qui peuvent représenter jusqu'à 60% du contingent immunitaire infiltrant les articulations et produisant de grande quantité d'IL-8 et de métalloprotéinases de la matrice (MMP). Il contient aussi de nombreux LB activés qui produisent des auto-anticorps, mais également des Mφ qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-1β et TNF-α et des LTCD4 de type Th17 produisant de l'IL-17A et contribuant au recrutement des neutrophiles.

Les Treg ont aussi été largement étudiés dans la PR mais les conclusions quant à leur abondance et leur fonctionnalité dans cette pathologie ne rencontrent encore aujourd'hui pas un consensus fort (Prakken et al., 2013). Certains décrivent une fréquence diminuée des Treg chez les patients, expliquant de fait un contrôle négatif moindre des populations inflammatoires (Lawson et al., 2006). D'autres études suggèrent une perte de fonctionnalité des Treg qui n'est pas forcément associée à une plus faible fréquence (Herrath et al., 2014; Wehrens et al., 2011). Une méta-analyse récente des données disponibles suggère que ces résultats diffèrent du fait d'une variabilité dans la définition de la population de Treg (Morita et al., 2016). CD25 et FoxP3 pouvant en effet être également exprimés transitoirement par des LTCD4 non régulateurs activés (Kmieciak et al., 2009), nombreux dans la PR, la stratégie d'identification des Treg peut influencer sur les fréquences considérées. D'après cette méta-analyse, il semblerait donc qu'une augmentation de la fréquence des Treg soit globalement retrouvée dans le liquide synovial (LS) d'articulations inflammées mais pas en périphérie.

La destruction articulaire est initiée par cet afflux de cellules immunitaires inflammatoires qui dérèglent le fonctionnement tissulaire au niveau local, menant à la synovite caractérisée par la destruction de l'os et du cartilage. Le pannus, région de la membrane synoviale riche en ostéoclastes responsables du remodelage et de l'homéostasie tissulaire au niveau des articulations, prolifère de manière anormale et les ostéoclastes activés détruisent l'os. Le cartilage est en revanche dégradé par les enzymes sécrétées par des cellules spécialisées du stroma articulaire: les synoviocytes et les chondrocytes activés (Choy, 2012).

Les synoviocytes sont des cellules mésenchymateuses composant la couche superficielle de la membrane synoviale des articulations diarthrodiales et des gaines des tendons. Il en existe deux types : le type A ou « synoviocytes macrophagiques » et le type B ou « synoviocytes fibroblastiques ». Ils garantissent l'homéostasie tissulaire au niveau de la membrane synoviale en régulant notamment la production de LS, l'inflammation et la circulation des cellules immunes. Ils contribuent ainsi activement à l'intégrité de la capsule articulaire (Iwanaga et al., 2000; Mor et al., 2005). L'interaction entre les cellules immunes et les synoviocytes de type B au niveau de l'articulation promeut leur prolifération et leur activation et conduit à une destruction tissulaire supérieure à la réparation. L'accumulation des synoviocytes dans l'articulation est à ce titre une caractéristique de la PR établie (Kramer et al., 2003). Dans la PR, les synoviocytes sont en effet moins sensibles à l'apoptose (Korb et al., 2009) et ont un phénotype pathologique caractérisé par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines permettant le recrutement de cellules immunes inflammatoires ainsi que d'enzymes protéolytiques détruisant la matrice extracellulaire telles que MMP1 et MMP3 impliquées dans l'atteinte du cartilage (Bartok and Firestein, 2010). Ces cellules acquièrent également des propriétés invasives qui contribuent à la dissémination de la pathologie vers d'autres articulations (Lefèvre et al., 2009). Ces fonctions pathogéniques sont en partie induites par la production d'IL-17A au niveau des articulations inflammées. Je m'attarderai à présent sur le rôle de cette cytokine pro-inflammatoire et sur les populations de LTCD4 qui la produisent dans le contexte de la PR.

- ***L'IL-17A, les Th17 et les Th1.17 dans la PR***

L'IL-17A joue un rôle central dans la pathogenèse de la PR. Elle contribue en effet à la chronicité de la maladie en maintenant l'inflammation, en stimulant le recrutement de



neutrophiles et de monocytes inflammatoires et en promouvant la différenciation pathogénique d'autres types cellulaires tels que les synoviocytes. Une boucle d'activation auto-entretenu existe en effet dans la PR entre les LTCD4 Th17 et les synoviocytes et il a été montré que l'IL-17A participe à l'induction du phénotype invasif des synoviocytes (Hot et al., 2012). En retour, ces synoviocytes activés participent à la survie et à la différenciation Th17 (Burman et al., 2005).

Les Th17, de par leur production d'IL-17A sont, de fait, considérés comme un sous-type ostéoclastogénique, car ils induisent l'expression, par les synoviocytes de type B et les ostéoblastes, de RANKL (ligand du récepteur activateur de NF- $\kappa$ B) qui est un fort stimulateur de l'activation et de la maturation des ostéoclastes responsables de la destruction osseuse observée dans les articulations atteintes (Braun and Zwerina, 2011; Kotake et al., 1999). Il est de plus établi que cette cytokine pro-inflammatoire est sécrétée non seulement par les Th17 mais également par les Th1.17 et l'interaction réciproque entre ces deux populations Th est complexe (*cf. Introduction Partie I*). Leur rôle dans la PR n'est pas clairement défini mais il semblerait que la présence relative des Th1.17 soit liée au contexte inflammatoire (Basdeo et al., 2017; Nistala et al., 2010). Ces Th1.17 étant plus polyfonctionnels, ils jouent un rôle pathogénique important dans la PR. Ces cellules sont donc centrales dans la pathogenèse de la PR mais aucun consensus n'existe quant à la hiérarchisation de leur implication ni l'importance du sous type considéré.

### **c. Diagnostic et traitements de la PR**

L'examen clinique permettant le diagnostic de la PR repose sur un examen biologique ainsi que sur la radiologie qui permet d'évaluer l'ampleur de l'atteinte articulaire. Le dosage de la protéine C-réactive (CRP) permet d'évaluer l'intensité de l'inflammation. Cette variable entre en compte dans l'établissement d'un score de la maladie appelé le DAS28-CRP qui prend également en compte le nombre d'articulations atteintes, et la gravité de ces atteintes (évaluation de la douleur et de la raideur associées à chacune) (Inoue et al., 2007; Prevo et al., 1995). Ce score permet de classer les patients et d'évaluer leur réponse au traitement en fonction de ses variations. Des marqueurs solubles spécifiques de la PR, pouvant être dosés dans le plasma des patients, comme le facteur rhumatoïde (FR), une classe d'auto-anticorps dirigés contre le fragment Fc

des immunoglobulines de type G (IgG), et les anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) permettent d'affiner le diagnostic mais tous les patients ne présentent pas forcément des taux élevés de ces molécules (Aletaha et al., 2010).

D'un point de vue thérapeutique, de nombreuses molécules sont utilisées pour enrayer l'inflammation chronique et la destruction tissulaire chez les patients diagnostiqués avec une PR. Une activité faible de la maladie ou la rémission sont aujourd'hui atteignables grâce à l'arsenal thérapeutique existant. On distingue classiquement les agents synthétiques des biomédicaments, plus récents et développés grâce à l'avancée de la compréhension du fonctionnement de la pathologie. L'ensemble de ces molécules est regroupé sous le terme de DMARDs pour « disease-modifying anti-rheumatic drugs ». On distingue les DMARDs synthétiques (sDMARDs) des DMARDs biologiques (bDMARDs).

Les sDMARDs comprennent notamment le leflunomide (LEF), le sulfasalazine (SSZ), l'hydroxychloroquine (HCQ) et le MTX, membre incontournable de l'arsenal thérapeutique dans la PR (Singh Jasvinder A. et al., 2015). Le MTX est un analogue des folates. Administré à faible dose (jusqu'à 15-20mg/ semaine) dans le traitement de la PR, il permet d'inhiber l'enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) et de potentialiser la voie de production de l'Ado suite à l'inhibition des enzymes ADA et AMPDA (AMP déaminase) (Brown et al., 2016). Le MTX reste le traitement de première intention de la PR malgré l'émergence plus récente d'autres molécules. L'utilisation de doses variables de glucocorticoïdes (GC) peut également être envisagée mais de nombreuses résistances à ces traitements sont observées, notamment du fait de la capacité des cellules immunitaires exprimant le transporteur ABC MDR1 à les exclure de leur cytoplasme (*cf. Introduction Partie IV*).

Parmi les bDMARDs développés au cours de ces vingt dernières années, on trouve des anticorps ciblant les cytokines ou leurs récepteurs directement impliqués dans la physiopathologie de la maladie telles que TNF- $\alpha$  (Adalimumab, Etanercept, Infliximab), l'IL-17A (Ixekizumab), l'IL-6R (Tocilizumab) ou encore l'IL-1RI (Anakinra). Ces bDMARDs ajoutent une dimension à l'arsenal thérapeutique disponible. Cependant, des proportions variables de patients répondent aux monothérapies par ces anticorps (Fischer Jens A. A. et al., 2014) ce qui implique la mise en place de combinaisons thérapeutiques coûteuses pour atteindre de meilleurs taux de réponse. Des études ont également combiné le MTX et certains de ces anticorps (Etanercept, Adalimumab) démontrant une amélioration des signes cliniques

supérieure à l'effet du MTX seul dans la plupart des cas (Emery et al., 2015; Kavanaugh et al., 2013).

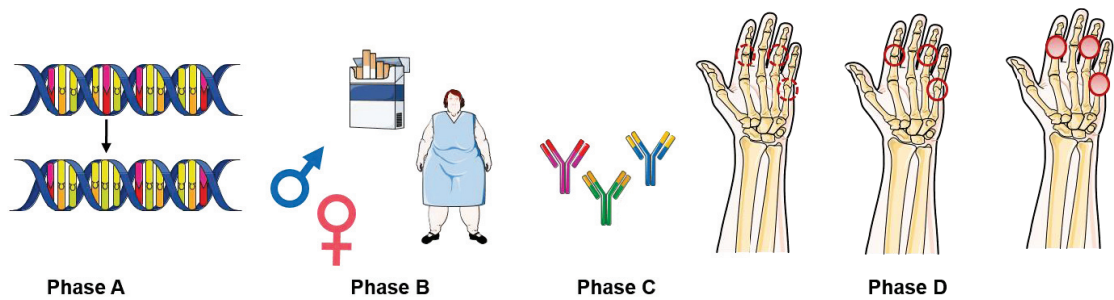
## **2. LE RPso : ETIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE ET TRAITEMENT**

Le lien entre la pathogenèse du psoriasis (Pso) et du RPso est aujourd'hui encore soumis à controverse. Alors que certaines études défendent le fait que le RPso est une manifestation extra-cutanée du Pso et donc une comorbidité de ce dernier qui touche environ 25 à 30% des patients psoriasiques (Jr et al., 2006; Zachariae, 2003), d'autres études tendent à montrer une origine génétique différente de ces deux affections (Ciocon and Kimball, 2007; FitzGerald and Dougados, 2006). Des données solides établissent un parallèle entre les deux pathologies et montrent les différences qui les séparent. Dans un souci de compréhension et de synthèse, je décrirai donc brièvement ce qui est connu de l'étiologie et de la physiopathologie du Pso et les liens qui peuvent être établis avec l'émergence d'une forme arthritique de la pathologie en m'attardant sur ce qui est connu dans le RPso. La **Figure 8** établit par ailleurs une comparaison des facteurs entrant en jeu dans le développement des deux pathologies articulaires considérées.

### **a. Etiologie**

Il est estimé que 2 à 3 % de la population mondiale souffre de Pso à différents niveaux de gravité (Menter et al., 2008). En plus du RPso, d'autres comorbidités comme un risque cardio-vasculaire élevé, des uvéites ou des troubles psychiatriques sont relativement fréquentes chez les patients atteints de Pso (de Oliveira et al., 2015). Comme la PR, le Pso et le RPso sont des pathologies multifactorielles dont l'étiologie reste mal définie. Des facteurs génétiques et environnementaux semblent mis en jeu dans leur développement. Des études récentes tentent de distinguer les facteurs de susceptibilité au Pso et ceux associés au développement subséquent du RPso (Busse and Liao, 2010). Etant donné que le RPso se développe sur un terrain psoriasique, des signes cliniques tels qu'une spondylite, une enthésite ou encore le développement d'uvéite chez les patients atteints de Pso sont des arguments de suspicion de RPso et peuvent permettre de le détecter, grâce à un suivi renforcé des patients, avant l'apparition de manifestations articulaires *per se*. Le facteur génétique est important

dans le Pso et le RPso. Comme pour la PR, nombre de polymorphismes génétiques sont associés à une susceptibilité accrue au Pso et au RPso. Neuf loci désignés PSORS 1 à 9 ont été associés au Pso. Parmi eux, PSORS1 code pour le variant du HLA de type I, HLA-Cw6 associé dans plusieurs études à une forte susceptibilité à la fois au Pso et au RPso (Griffiths and Barker, 2007). Les variants **HLA-B27** et **HLA-B39** sont quant à eux spécifiquement associés au RPso (Bluett and Barton, 2012; Veale, 2013). De plus, l'expression du variant HLA-B27 corrèle avec des gènes signature de la fonction LTC4 ce qui renforce notamment l'idée que ce variant pourrait contribuer à la sélection d'un répertoire de lymphocytes T auto-réactifs (Bluett and Barton, 2012). Des polymorphismes identifiés dans la voie IL-23/IL-17 (SNP associés aux gènes *IL-23R*, *TRAF3IP2*) ou encore dans le gène codant pour l'IL-13 sont fortement associés avec l'occurrence de RPso (Duffin et al., 2009; Suzuki et al., 2014). L'établissement formel du rôle de facteurs environnementaux associés au RPso est assez compliqué du fait de la forte hétérogénéité de la pathologie. Comme pour la PR, il semble que des habitudes alimentaires ainsi que la consommation de tabac contribuent au développement ou à l'accentuation du RPso (Duffin et al., 2009). L'obésité, le stress, de forts traumatismes, la prise de certains médicaments ou encore l'infection par certains pathogènes (notamment des infections à streptocoques) sont associés au Pso ainsi qu'à l'aggravation de cette pathologie (Telfer et al., 1992). Concernant ce dernier point, il a été proposé que des mécanismes de mimétisme moléculaire pathologique entre l'Ag streptococcal M et les kératines de type-I soient à l'origine de l'activation de LT spécifiques des streptocoques capables d'initier la pathologie dans la peau en ciblant également les tissus et les cellules produisant les kératines *i.e.* les kératinocytes (Prinz, 2001, 2004). Il est également possible que ces facteurs influencent le développement du RPso chez les personnes à risque.



	Prédisposition Risque génétique	Facteur hormonaux & environnementaux	Auto-immunité systémique	Stades d'évolution de la pathologie: symptômes sans arthrite puis arthrite identifiable avec atteinte osseuse
PR	Gènes codant pour les molécules de HLA (notamment région de l'épitope partagé)	Tabac Polluants atmosphériques Habitudes alimentaires Exposition à certains pathogènes Femmes plus fréquemment atteintes	Détection fréquente de protéines citrullinées et de facteur rhumatoïde	Pathologie poly-articulaire symétrique touchant en premier lieu les articulations diarthrodiales. La phase symptomatique correspond à l'activation chronique de l'immunité effectrice
RPso	Association spécifique avec certains polymorphismes (HLA-B27 et HLA-B39) Mutations fréquentes de gènes de l'immunité.	Tabac Surpoids et obésité Habitudes alimentaires Forts traumatismes Exposition à certains pathogènes Sexe ratio non biaisé	Pas de signe pathognomonique ou de test sérologique spécifique connu	Survenue des symptômes sur un terrain psoriasique établi le plus fréquemment. Atteintes musculo-squelettiques variées; squelette axial, entésites, dactylites Arthrite oligo-articulaire ou poly-articulaire

**Figure 8 : Etiologie comparée de la PR et du RPso.** Des facteurs génétiques et environnementaux importants sont identifiés. Les manifestations cliniques des deux pathologies articulaires présentent des spécificités. (Adapté de Alpizar-Rodriguez et al. Semin Immunopathol 2016 et Gladman et al. Ann Rheum Dis 2005)

## b. Physiopathologie

Le Pso est une pathologie auto-immune caractérisée par une hyperplasie de l'épiderme due à une prolifération incontrôlée des kératinocytes alimentée par une infiltration de cellules immunitaires pro-inflammatoires au niveau des lésions qui entretiennent l'inflammation. Cela se traduit au niveau clinique par l'apparition, souvent sur des parties de l'organisme exposées aux chocs (coudes, genoux), de plaques de peau épaisses bien délimitées appelées squames (Griffiths and Barker, 2007). Chez 80% des patients, le RPso se développe dans les dix ans suivant le diagnostic du Pso (Gladman et al., 2005) et est caractérisé par une inflammation chronique et une destruction tissulaire au niveau articulaire. Le lien entre l'atteinte cutanée et l'atteinte articulaire observées chez des patients atteints de Pso et développant subséquentement un RPso reste mal compris, notamment du fait de l'hétérogénéité clinique du RPso (FitzGerald

et al., 2015). L'atteinte musculo-squelettique peut de surcroît prendre plusieurs formes et les articulations concernées sont variées : il peut s'agir d'atteintes du squelette axial, des articulations périphériques, des sites d'insertion musculo-tendineuses (enthésites) ou des doigts (dactylites) (Gladman, 2015). On distingue l'atteinte oligo-articulaire classique mais pouvant impliquer avec le temps d'autres articulations, de l'atteinte asymétrique. Cette dernière implique souvent une atteinte spinale discontinue ainsi que des signes de sacro-iléite. Dans les deux cas, l'examen radiographique révèle des signes semblables à savoir une érosion osseuse et la production anarchique de tissus osseux en position juxta-articulaire (Busse and Liao, 2010).

Sur le plan immunobiologique, deux phases sont identifiées dans la progression du Pso : une phase d'initiation qui instaure l'inflammation chronique suivie d'une phase de maintenance qui entretient cet état d'inflammation. La phase d'initiation met en jeu l'activation et la maturation de DC myéloïdes du derme ainsi que des pDC par des signaux de danger tels que le complexe cathélicidine (LL37)/ADN du Soi (Lande et al., 2007) ou d'autres peptides dont les gènes font partie des loci PSORS (protéines S100,  $\beta$ -défensines) (Batycka-Baran et al., 2014). Une fois activées, ces DCs résidentes produisent de l'IL-23 et de l'IL-12p70, deux cytokines clés dans la différenciation Th1 et Th17 (*cf. Introduction Partie I*) qui sont impliquées dans la phase de maintenance de l'inflammation *via* leur production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-17A, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  et IL-22 (Haider et al., 2008; Zaba et al., 2009). De manière intéressante, l'IL-23 active également des LTCD8 IL-17A<sup>+</sup> ainsi que des lymphocytes T $\gamma\delta$  IL-23R<sup>+</sup>, deux populations lymphocytaires activement impliquées dans la phase d'entretien de l'inflammation dans le Pso (Lowes et al., 2013). L'IL-17A joue un rôle clé dans plusieurs phénomènes associés à la persistance des lésions psoriasiques notamment la prolifération incontrôlée des kératinocytes qui est également accompagnée d'une modification de la vascularisation dans les lésions du fait de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF dont la production est également stimulée par l'IL-17A (Raychaudhuri et al., 2015).

Les lésions articulaires associées au RPso sont également caractérisées par un fort infiltrat en DC inflammatoires, en M $\phi$  et en LT (Karczewski et al., 2016). La présence de LTCD8 IL-17<sup>+</sup> a été rapportée dans le LS d'articulations inflammées chez des patients atteints de RPso et leur abondance corrèle avec la sévérité de la maladie suggérant un rôle de ces LTCD8 dans la physiopathologie du RPso (Menon et al., 2014). Les populations de Th sont également impliquées dans le RPso en contribuant

au maintien de l'inflammation. Parmi eux, les Th17 et les Th22 sont particulièrement étudiés dans le Pso et le RPso. Les Th22, du fait de leur rôle physiologique de préservation des muqueuses et notamment de la peau sont en effet naturellement présents dans le derme et l'épiderme. L'IL-22 sécrété en grande quantité par les Th22 ou les Th17 activés a cependant un effet amplificateur de la réponse inflammatoire observé dans les lésions psoriasiques. Une augmentation du nombre de cellules IL-17<sup>+</sup> et IL-22<sup>+</sup> est notamment observée dans le sang des patients atteints de Pso et de RPso. Cependant, au niveau des tissus inflammés des différences existent. Il a pu être établi que la production d'IL-17 et d'IL-22 est élevée au niveau des lésions cutanées de Pso, alors que seule l'IL17A est détecté à de fortes concentrations dans le LS d'articulations inflammées de RPso (Benham et al., 2013). Cela semble indiquer que les acteurs cellulaires responsables du RPso, bien que sûrement induits par l'inflammation chronique systémique induite dans la cadre du Pso, diffèrent de ceux responsables de la pathologie dermatologique. Le point commun reste cependant une forte activité de l'IL-17A qui a de nombreux rôles délétères dans le RPso. Les Th9, un sous-type de Th encore peu étudié, semblent également impliqués dans l'entretien du Pso notamment en contribuant à la différenciation Th17 (résultats chez la souris) (Singh et al., 2013). Il a de plus été montré que les Th9 humains ont un tropisme préférentiel dans la peau ce qui renforce l'idée de leur implication dans le Pso (Schlapbach et al., 2014). L'IL-9 semble également contribuer à l'angiogenèse observée au niveau des lésions psoriasiques en stimulant la production de VEGF par les mastocytes et les kératinocytes (Ma et al., 2014a; Sismanopoulos et al., 2012). L'élucidation du rôle exact de cette population dans la biologie du Pso et du RPso nécessite néanmoins des études plus poussées.

Le Pso et le RPso partagent donc des caractéristiques similaires avec une présence accrue de cellules myéloïdes inflammatoires produisant de l'IL-23, une cytokine clé dans le maintien d'un environnement pro-Th17, et de LTCD4 et LTCD8 auto-réactifs au niveau des lésions psoriasiques ainsi que dans les articulations atteintes dans le cas du RPso.

- ***L'IL-17A, les Th17 et les Th1.17 dans le RPso***

L'axe IL-23/IL-17A contribue de multiples manières à la pathogenèse du RPso. IL-23, en favorisant la différenciation Th17, permet l'accentuation de l'inflammation au

niveau du pannus dans les articulations atteintes, l'érosion articulaire ainsi que la formation anarchique de nouveaux tissus osseux (Raychaudhuri et al., 2015). Ces effets sont amplifiés *via* la sécrétion, par les Th17, d'IL-17A et d'IL-22, qui contribuent à l'inflammation synoviale, à l'angiogenèse et au trafic cellulaire (Lowe et al., 2013; Mitra et al., 2012). Des études ont montré non seulement un enrichissement en Th17 dans le LS d'articulations de patients RPso mais également une expression accrue du récepteur de l'IL-17A (IL-17RA) par les synoviocytes de type B, qui sécrètent alors plus d'IL-6 et d'IL-8 et participent activement à l'amplification de la réponse inflammatoire (Raychaudhuri et al., 2012b). Malgré de nombreuses études récentes détaillant la nature de l'infiltrat T dans les articulations inflammées de RPso, il n'est pas fait clairement état de l'implication d'une population de Th1.17 ou Th17 pathogéniques contrairement à la PR. Le phénotype instable de cette population ou bien le fait que l'IFN- $\gamma$  ne soit pas considéré comme pathogénique dans le RPso pourrait expliquer le manque de données. Les résultats disponibles montrent cependant un rôle de différentes cytokines (IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$ ) toutes sécrétées également par des Th1.17. Il n'est donc pas à exclure que ces cellules soient impliquées dans la physiopathologie du RPso.

### **c. Diagnostic et traitements du RPso**

Il n'existe pas de test pathognomonique, sérologique ou d'imagerie définis pour le diagnostic d'un RPso. Il repose sur un faisceau d'indices cliniques incluant la présence de plaques de Pso, l'augmentation de la valeur de paramètres biologiques non spécifiques de mesure de l'inflammation (CRP élevée, vitesse de sédimentation élevée ou activation du complément) ainsi qu'un examen radiologique révélant une atteinte articulaire (Gladman et al., 2010).

Le traitement initial du RPso inclut les mêmes sDMARDs que pour la PR à savoir le MTX, la SSZ ainsi que les GC. Cependant, l'arrivée récente dans l'arsenal thérapeutique des anticorps anti-TNF- $\alpha$  a permis d'obtenir de très bons résultats dans le traitement du RPso même si une part non négligeable des patients n'y répond pas ou peu (Ritchlin and Krueger, 2016). Le développement de thérapies ciblant l'IL-17A et l'IL-23 semblent également prometteur dans le traitement du RPso du fait de l'implication des Th17 dans la physiopathologie de la maladie. Des essais cliniques de phase III avec des



anticorps anti-IL-17A (Secukinumab, Ixekizumab) et anti-IL-17RA (Brodalumad) ont démontré une efficacité importante de la neutralisation de la signalisation de cette cytokine chez des patients atteints de Pso, associée à une amélioration notable des symptômes du RPso chez les patients concernés (Farahnik et al., 2016).

### **3. ROLE DE L'AXE ADENOSINERGIQUE DANS LA PR ET LE RPso**

Peu de données existent sur l'expression des ecto-enzymes CD39 et CD73 et leur impact biologique dans les contextes de PR et de RPso chez l'Homme. Des données récentes chez la souris montrent qu'une expression de CD73 sur les cellules non hématopoïétiques a un effet protecteur dans des modèles d'arthrite induite au collagène (AIC) (Chrobak et al., 2015). L'injection d'un agoniste de A2aR permet également de limiter les signes cliniques de l'AIC dans des souris CD73-déficientes qui présentent alors une pathologie semblable à celle d'animaux non déficients. Des études chez l'Homme se sont intéressées à la population de Treg exprimant CD39. Les Treg CD39<sup>+</sup> sont enrichis dans les articulations de patients atteints de PR mais, bien qu'ils conservent leur capacité suppressive *in vitro*, ils n'ont pas d'impact sur la production d'IL-17A par les Teff (Herrath et al., 2014).

Une étude récente chez de jeunes patients atteints d'AJI montre qu'une expression réduite de CD73 sur les lymphocytes synoviaux au niveau des articulations inflammées est associée à une réduction de la production d'Ado et à une plus grande sévérité de la pathologie (Botta Gordon- Smith et al., 2015). Ces données suggèrent donc qu'une réactivation ou une amélioration de la signalisation adénosinergique dans la PR mais aussi le RPso *via* l'augmentation/la stabilisation d'expression de CD73 pourrait contribuer à améliorer les signes cliniques chez ces patients. L'utilisation d'agonistes des récepteurs A2a et A2b pourrait également constituer une nouvelle approche dans le traitement de ces pathologies.

De plus, la mise en évidence d'un rôle du MTX dans la balance du métabolisme de l'Ado semble indiquer qu'un traitement par MTX pourrait agir comme modulateur de l'axe d'immunosuppression CD39/CD73 en favorisant la présence d'Ado en extracellulaire (Cronstein and Sitkovsky, 2017). Le MTX pourrait avoir un rôle indirect sur l'expression des ecto-enzymes CD39 et CD73 dont l'expression est aussi régulée par la balance purinergique. Du fait de l'association établie entre l'expression de CD73 avec certaines sous populations de Th, il apparaît donc intéressant de se pencher sur l'effet

du MTX sur la fréquence et la modulation des populations Th et leur expression respective de CD73.

Ces questions constituent la base du travail que j'ai développé dans l'un des axes de ma thèse visant à caractériser les populations de LTCD4 Th exprimant CD73 dans le sang périphérique de patient atteints de PR ou de RPso avant traitement ou en cours traitement par MTX, en m'attardant sur les populations Th1.17 et Th17 dont l'action semble prépondérante dans le maintien de l'inflammation dans au moins une de ces deux pathologies. Ces données sont présentées dans la partie **Résultats- II**.

#### IV. EXPRESSION DE MDR1 PAR LES LYMPHOCYTES T : REVUE

Du fait de la forte expression de MDR1 sur les Th1.17 démontrée par Ramesh *et coll.* (Ramesh et al., 2014), des données obtenues au cours de ma thèse sur l'expression de ce transporteur par les Teff CD73<sup>+</sup> chez l'Homme (Gourdin et al., 2018) et de l'impact fonctionnel de ce transporteur sur les cellules qui l'expriment, il m'est apparu important de faire un résumé de l'état de l'art de ce qui est connu sur l'expression et les fonctions de cette molécule au sein du système immunitaire et particulièrement sur les LTCD4 et LTCD8. Les informations disponibles dans la littérature sont présentées sous forme de revue qui clôt mon introduction.

Marion Bossennec, Anthony Di Roio, Christophe Caux, Christine Ménétrier-Caux

« MDR1 in immunity: friend or foe? » / MDR1 dans l'immunité : ami ou ennemi ?

Accepté pour publication dans le Journal Oncoimmunology.

##### **Résumé de la revue en français :**

MDR1 est une protéine transmembranaire de la famille des transporteurs ABC. Son fonctionnement est ATP-dépendant et permet l'exclusion du milieu intracellulaire de nombreuses molécules dont beaucoup de xénobiotiques impliqués dans le traitement de diverses pathologies. MDR1 est exprimé de manière relativement ubiquitaire dans les tissus du fait de sa fonction première de détoxification cellulaire. Il a notamment été largement étudié pour son induction de résistance aux chimiothérapies dans de nombreux types de tumeurs solides ou hématologiques. Après un bref rappel du fonctionnement de MDR1 et de sa spécificité, cette revue propose de s'attarder sur le rôle que peut jouer ce transporteur dans la modulation des cellules du système immunitaire et ses possibles implications dans le contexte de pathologies auto-immunes ou tumorales.

## MDR1 in immunity: friend or foe?

Marion Bossennec, Anthony Di Roio, Christophe Caux & Christine Ménétrier-Caux

To cite this article: Marion Bossennec, Anthony Di Roio, Christophe Caux & Christine Ménétrier-Caux (2018): MDR1 in immunity: friend or foe?, *Oncolmmunology*, DOI: [10.1080/2162402X.2018.1499388](https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388>



© 2018 The Author(s). Published by Taylor & Francis Group, LLC



Published online: 06 Sep 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## MDR1 in immunity: friend or foe?

Marion Bossennec<sup>a,b</sup>, Anthony Di Roio<sup>a,b</sup>, Christophe Caux<sup>a,b</sup>, and Christine Ménétrier-Caux<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon France; <sup>b</sup>Immunology Virology Inflammation (IVI) department, Team "Therapeutic targeting of the tumor cells and their immune stroma", Lyon, France

### ABSTRACT

MDR1 is an ATP-dependent transmembrane transporter primarily studied for its role in the detoxification of tissues and for its implication in resistance of tumor cells to chemotherapy treatment. Several studies also report on its expression on immune cells where it plays a protective role from xenobiotics and toxins. This review provides an overview of what is known on MDR1 expression in immune cells in human, and its implications in different pathologies and their treatment options.

### ARTICLE HISTORY

Received 14 June 2018  
Accepted 8 July 2018

### KEYWORDS

MDR1; Th1.17; chemo-resistance; drug efflux; anti-tumor immunity; autoimmunity; immune regulation; inhibitors; combination therapy

## Introduction

The Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1/P-gp) belongs to the ABC (ATP-binding cassette) transporters family which includes 48 members in human.<sup>1,2</sup> This efflux pump can exclude several substances such as medical drugs from cells. Consequently, its role has been largely investigated in cancer cells owing to its contribution in chemotherapy resistances.<sup>3,4</sup>

Physiologically, MDR1 is expressed in several tissues (intestine, colon, placenta, liver, blood brain barrier) where it plays a protective role by reducing the accumulation of xenobiotic molecules in sensitive organs or cells. In addition, MDR1 is also involved in secretion processes as it allows the release of lipid molecules, such as steroid hormones and corticoids,<sup>5,6</sup> but also peptides like amyloid- $\beta$ .<sup>7</sup>

Over the last decade, several studies have shown the expression of MDR1 in immune cell subsets at different levels and the importance of its expression as well as its functionality to achieve different cellular processes. Nevertheless, MDR1 expression in specific immune cells can influence the treatment of autoimmune diseases and HIV patients. In the context of tumors, the expression of MDR1 on different immune populations could be an advantage as it will confer them resistance to chemotherapy as described for cancer cells, and thereby limit the corresponding immune suppression of these compounds.

In this review, we briefly describe the already well detailed structure of MDR1 and give an overview on current knowledge about its substrates and regulators, with a specific interest for immune modulating drugs. We then focus on the expression and functionality of MDR1 in the different human innate and adaptive immune cell subsets. Finally, we discuss the concerns of MDR1 expression on immune populations when considering treatment options in various pathologies with immune cell deregulations.

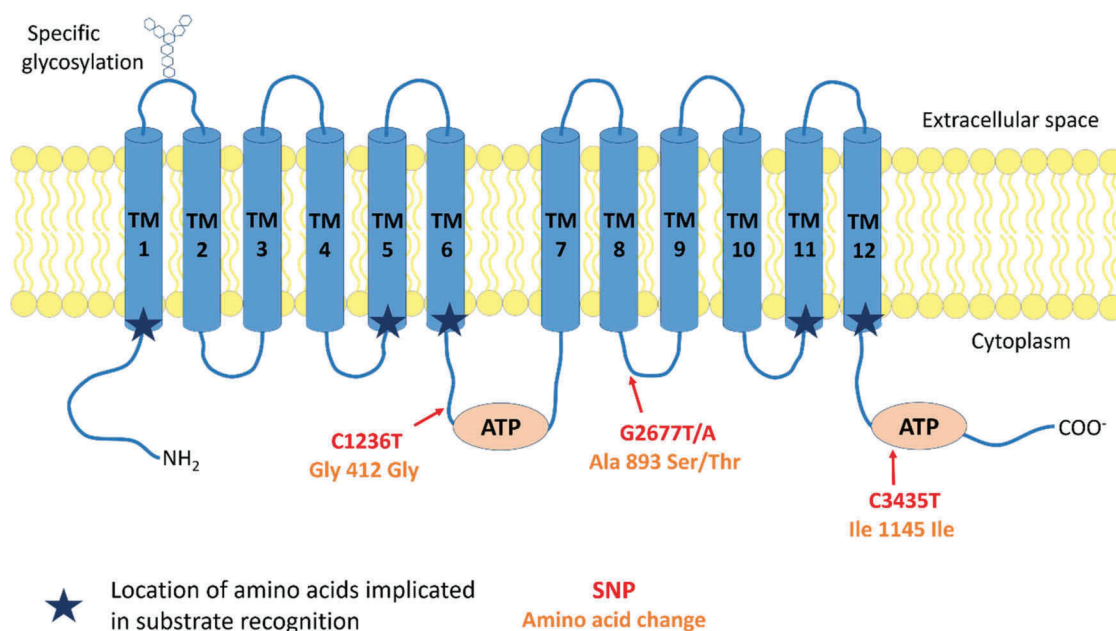
## Part I: molecular biology of MDR1

Studies carried out on MDR1 during these last decades allowed to better understand the functionality and regulation of this transporter. This was achieved using structure modelling, substrate identification and the use of specific inhibitors.

### 1- Gene and protein structure

MDR1 is encoded by the *ABCB1* gene, consisting of a 210 kb region with 29 exons, located on chromosomal region 7q21 that contains also the *ABCB4* gene, coding for MDR2/3 implicated in phosphatidylcholine transport. Its transcription gives rise to 4 mRNA variants, translated, for three of them, into a single protein of 1280 amino acids.<sup>8</sup> At the protein level (Figure 1), MDR1 is formed by a single 170 kDa monomer of 12 transmembrane domains (TMs), glycosylated on its first extracellular loop (between TM1 and 2).<sup>1,2</sup> Two distinct cytoplasmic ATP binding sites, respectively located on the loop between the TMs 6 and 7 and after the TM 12, work alternatively and cooperatively to efflux the substrate.<sup>9</sup>

Due to the conformational arrangement of its TMs in two pseudo-symmetric bundles of six helices, with the TMs 1–3,6,10,11 and TMs 4,5,7–9,12, having each one nucleotide binding domain, MDR1 forms an active pore.<sup>10</sup> Directed mutagenesis performed on the different TMs of MDR1 revealed the implication of different residues on the TMs 1, 5, 6, 11 and 12 in substrates recognition (Figure 1). However, the interaction domains of MDR1 with its different substrates are variable and depend on both their nature and conformation. For instance, the F335A mutation on TM 6 induces a decreased efflux of actinomycin D and vinblastine without modulation of the transport of doxorubicin and colchicine.<sup>11–13</sup>



**Figure 1.** Protein structure and conformation of MDR1.

MDR1 is composed of 12 transmembrane domains (TMs) and two cytoplasmic ATP binding domains located on the loop between the TMs 6 and 7 and the loop after the TM 12. The first extracellular loop is glycosylated. The location of the 3 most frequent MDR1 SNPs (C1236T, G2677T/A and C3435T) are reported on the molecule according to the location of their corresponding amino acid. Changes implied in amino acid are also indicated. Two (C1236T and C3435T) out of the three SNPs are silent mutations. They improve however transcription processes.

## 2- Substrates and inhibitors

MDR1 effluxes a large variety of molecules differing in their chemical structure (cyclic, linear, charged or not, hydrophobic, aromatic) as well as their molecular weight (250 to 4000 Da).<sup>1</sup> We find some endogenous compounds like amyloid- $\beta$ , steroids and platelet-activating factor (PAF)<sup>5-7,14</sup> but mainly a very large number of therapeutic drugs (Table 1).<sup>15</sup> However, two other important ABC transporters, Breast Cancer Resistance Protein 1 (BCRP-1)<sup>16</sup> and Multidrug Resistance Protein 1 (MRP-1),<sup>17</sup> have also been implicated in chemotherapeutic resistance with a partially shared substrate specificity with MDR1 (Table 1). Polymorphisms of *ABCB1* can also modify the efflux capacities of various substrates. Among the 1816 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) described, only 566 give rise to missense mutations. In the literature, 3 SNPs (C1236T, G2677T/A and C3435T) well described due to their relative high frequency<sup>18</sup> have been extensively studied in different pathological contexts. In kidney-transplanted patients, C3435T polymorphism has an impact on the efficacy of the immune suppressant tacrolimus due to a decrease of intestinal drug absorption<sup>19</sup> but also immunosuppression resistance of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, observed on patients with TT genotype.<sup>20</sup> Other associations with specific pathologies have been established and are reviewed further in this review (cf. **Part III**- auto immunity and HIV).

Owing to MDR1 capacity to induce chemotherapeutic resistance on cells expressing it, many studies investigated MDR1 inhibitors. These have been classified into three generations according to their specificity and toxicity. The first generation of MDR1 inhibitors act as competitive inhibitors, such as the immunosuppressive cyclosporin-A and the calcium channel blocker verapamil. However, because of the

high and potentially toxic serum concentration required for complete MDR1 inhibition, these poor specific inhibitors were quickly abandoned for this use. The second generation of inhibitors, such as valsopodar (PSC833, cyclosporin-A analogue), possess high affinity for MDR1 and inhibit also other ABC transporters and the cytochrome P450-3A4 (CYP3A4) involved in drug metabolism.

More recently, a third generation of inhibitors, with increased specificity to MDR1 and lower toxicity, has been developed in which we can quote elacridar (GG918) and tariquidar (XR9576).<sup>21</sup> Nevertheless, new studies show that most of these recent inhibitors also inhibit BCRP-1 or MRP-1 to a certain extent. Zosuquidar (LY335979), that reached phase-III clinical trials to improve acute myeloid leukaemia (AML) treatment, possesses the highest specificity and efficiency.<sup>22,23</sup> The development of a fourth generation of inhibitors, even more specific and with lower toxicity, based on the use of natural products is still ongoing.<sup>24,25</sup> Other approaches to inhibit MDR1, like the use of the monoclonal antibodies (mAb) MRK-16<sup>26</sup> or UIC2,<sup>27</sup> have also been evaluated. However, UIC2 mAb inhibits only partially membrane expressed MDR1, due to its recognition of a conformational epitope only fully revealed in the presence of cyclosporin-A or valsopodar.<sup>28</sup> Moreover, the systemic use of such inhibitors should be cautious regarding their possible side effects, especially because of the important role played by MDR1 at the organism barrier sites to preserve sensitive organs from xenobiotics.

## 3- Regulation

In cancer cell lines, MDR1 is regulated at different levels.<sup>4</sup> Several studies have suggested the ability of PKC and PKA to increase the functionality of MDR1 or its membrane

**Table 1.** Substrates of MDR1 classified according to their use and chemical origins. Family and mode of action is specified for anti-tumor drugs substrates of MDR1. The substrates known to act as MDR1 inhibitors are in bold, substrates shared with BCRP-1 are mentioned with (\*) and substrates shared with MRP-1 are designated with (°).

Antitumor drugs				
Molecules	Family	Mode of action		
daunorubicin <sup>°</sup> , epirubicin <sup>°</sup> , doxorubicin (Adriamycin) <sup>°*</sup>	Anthracycline	DNA and RNA synthesis, topoisomerase II inhibition and chromatin damages induction		
docetaxel <sup>°</sup> , paclitaxel <sup>°</sup>	Taxane	Microtubules depolymerisation inhibition		
vincristine <sup>°</sup> , vinblastine <sup>°</sup>	Vinca-alkaloïd	Microtubules polymerisation inhibition		
etoposide <sup>°</sup> , teniposide	Podophyllo toxin	Topoisomerase II inhibition		
irinotecan <sup>°</sup> , topotecan	Camptothecin	Topoisomerase I inhibition		
mitoxantrone, bisantrene	Anthracenedione	DNA Alkylation		
melphalan <sup>°</sup>	Nitrogen mustard	DNA Alkylation		
mitomycin C	Antibiotic	Topoisomerase II inhibition, DNA Alkylation		
actinomycin D	Antibiotic	Transcription Inhibition		
<b>tamoxifen</b>	Anti-oestrogen	Oestrogen secretion reduction		
HIV Protease inhibitors	Antimicrobial agents	Steroids	Cardiac drugs	
amprenavir	amoxicillin	aldosterone	<b>AHC-93</b>	
indinavir <sup>°</sup>	azithromycin	estradiol <sup>°</sup>	bunitrolol	
nelfinavir	erythromycin	progesterone	carvedilol	
ritonavir <sup>°*</sup>	ciprofloxacin <sup>°</sup>	glucocorticoids:	celiprolol	
saquinavir <sup>°</sup>	clarythromycin	● cortisol	digoxin	
loopenavir	doxycyclin	● cortisone	digoxin	
	<b>ketoconazole</b>	● dexamethasone	diltiazem	
	<b>itraconazole</b>	● methylprednisolone	mibefradil	
	levofloxacin	● prednisone	<b>nicardipine</b>	
	puromycin		<b>quinidine</b>	
	rifampicin		prazosin	
	tetracycline		<b>reserpine</b>	
	sparfloxacin		talinolol	
			<b>verapamil</b>	
Anti-histamines	Fluorescent dye	Opioids	Immuno-suppressants	Others
cimetidine	calcein <sup>°</sup>	asimadoline	<b>cyclosporin A*</b>	carbazepine
fezo fenadine	hoechst 33342*	domperidone	sirolimus	<b>clomipramine</b>
phenothiazine	rhodamine 123 <sup>°</sup>	fentanyl	tacrolimus	<b>omeprazole*</b>
terfenadine		metadone		ondansetron Ranitidin
		morphine		<b>atorvastatin*</b>
		loperamide		amyloid β
		pentazocine		PAF

integration.<sup>29,30</sup> Other studies showed that the preferential localization of MDR1 in the lipid rafts and caveolae, characterized as detergent resistant membranes (DRM), is required for its functionality.<sup>31,32</sup> Indeed, cholesterol depletion that disrupts lipid rafts, abolishes membrane MDR1 localization and is associated with reduced efflux capacities.<sup>33,34</sup> Hypoxia can also induce MDR1 expression through the Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) that binds the promoter of *ABCB1* and activates its transcription.<sup>35</sup> The modulation of glucose levels and the oxidative stress also induces HIF-1 $\alpha$  and MDR1 expression.<sup>36,37</sup> MDR1 is also regulated at RNA level by micro RNAs (miR) such as miR-145, miR-27a and miR-331-5p that bind directly the 3'UTR of *ABCB1* mRNA to decrease MDR1 expression.<sup>38,39</sup> Some other miR (miR-137) indirectly decrease MDR1 expression by targeting the YB-1 transcription factor that upregulates MDR1 expression by fixation on *ABCB1* promoter.<sup>40,41</sup>

Only few studies have been interested in MDR1 regulation on immune cells, and this will be developed in **Part II**.

#### 4- MDR1 in animal models

Even if MDR1 is highly conserved during evolution, animal models do not completely reflect human organization of the locus coding for this transporter. Indeed, in mouse, *Mdr1* is encoded by 3 genes (*Mdr1a* (*Mdr3*), *Mdr1b* (*Mdr1*), *Mdr1c* (*Mdr2*)) that code for *Mdr1a*, *Mdr1b* and *Mdr1c* respectively.

Only *Mdr1a* and *Mdr1b* confer multidrug resistance while *Mdr1c* displays the same function as the human MDR2/3.<sup>42</sup> Even if the sequences of these two proteins are relatively similar to the human MDR1, *Mdr1a* and *Mdr1b* do not share the same substrates. Consequently, this should be taken into account when analyzing experiments evaluating drug effects or MDR1 inhibitors in mice.

Comparing of *Mdr1a*<sup>-/-</sup> and control mice enables also to evidence that *Mdr1a* modulates the functions of intraepithelial lymphocytes (IEL) in the small intestine. Indeed, lack of *Mdr1a* expression on these cells alter their proliferative capacity and their cytokine production (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) *in vitro*.<sup>43</sup> *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice also display a decreased regulatory T cells frequency (Treg) in the intestine, resulting from a reduction of induced Treg (iTreg) development from naïve CD4<sup>+</sup> T cells upon exposure to TGF- $\beta$ .<sup>44</sup>

#### Part II- MDR1 expression and function in immune cell populations

MDR1 is expressed by many immune cell types with functional consequences on their migration, differentiation, survival, or cytotoxic function. Molecular and cellular analyses of MDR1 expression in peripheral mononuclear cells show expression at high levels on NK cells and B cells. It is also present at the membrane of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and

recent studies highlight a tight association between MDR1 expression and the differentiation of specific T cell subsets. It is also found in some resident dendritic cell (DC) populations as well as in macrophages (M $\phi$ ) but not in monocytes. Thus, MDR1 plays determinant roles in all these subsets (Figure 2).

### 1- Innate immunity

**a Monocytes/M $\phi$ .** Monocytes express low *ABCB1* mRNA levels correlated with a limited capacity to excrete Rhodamine 123 (Rh123) substrate.<sup>45</sup> This expression is increased in monocyte-derived M $\phi$  but not homogeneously between M $\phi$  subtypes with higher expression by M2-M $\phi$  than M1-M $\phi$ .<sup>46</sup> Cytokines content in the inflammatory environment can also influence MDR1 expression in M $\phi$ . Indeed, using THP-1 cell line, Liu *et al.* demonstrated the upregulation of *ABCB1* by soluble factors including IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1 $\beta$  and LPS.<sup>47</sup> IFN $\gamma$  has also been shown to increase MDR1 expression in monocyte-derived M $\phi$ , the mechanism underlying this upregulation remains however still unknown.<sup>48</sup>

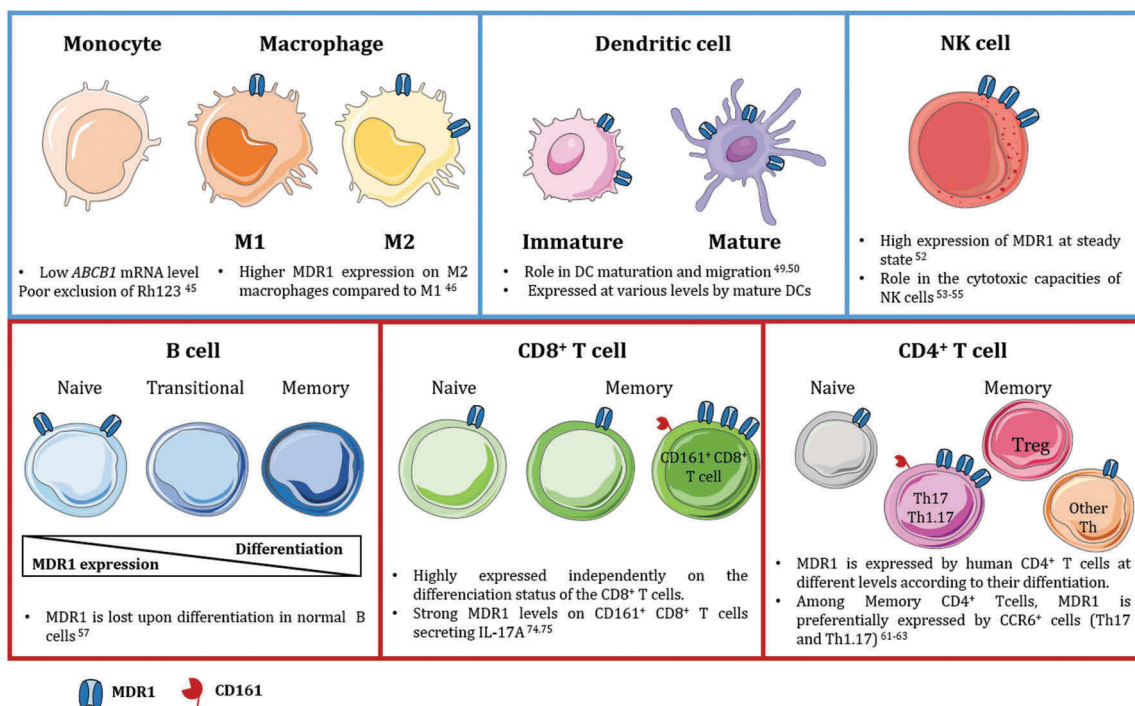
**b DC.** Many DC subtypes including Langerhans cells and monocyte-derived DC (MoDC) express varying MDR1 levels. Functionally, MDR1 is especially required for efficient DC maturation. Indeed, MDR1 blockade with valsopodar during DC differentiation inhibits their maturation, impairing their acquisition of activation markers like CD80 or CD40 as well as their IL-12p70 secretion capacity.<sup>49</sup> Furthermore, under hypoxia, MDR1 is expressed at higher level on mature DCs (DC-Lamp<sup>+</sup>) compared to immature ones, also suggesting a role in the maturation of iDCs and modulation of its function

by hypoxia. MDR1 is also required for DC migration as it mediates the production of an unidentified substrate triggering a migration signaling.<sup>50</sup> The MDR1 inhibitor verapamil was shown to specifically upregulate MDR1 expression in both MoDC and M $\phi$ <sup>51</sup> whereas no such effect has been described on immortalized hematopoietic cell lines or T cells.

**c NK cells.** Several studies conducted in the late 90's reported high expression of MDR1 on NK cells. It was also shown to be highly functional on these cells based on Rh123 assay.<sup>52</sup> Inhibition with verapamil decreases their cytotoxic functions in a dose dependent manner.<sup>53</sup> MDR1 might indeed influence the intracellular pH in NK cells and thereby their cytotoxic function.<sup>54</sup> Using cardiac drugs (AHC-93 and nocardipine) that are also MDR1 inhibitors, Takahashi *et al.* reported that in NK cells, MDR1 controls secretion of cytotoxic granules without modifying their Fas-mediated cytotoxicity.<sup>55</sup> These studies, however, rely on the use of unspecific first generation MDR1 inhibitors, and further studies with more specific inhibitors could help decipher its roles in NK cell biology.

### 2- Adaptive immunity

**a B lymphocytes.** In the early 90's, Chaudhary *et al* demonstrated the expression of functional MDR1 in B cells.<sup>56</sup> However, recent works evidenced that MDR1 expression remains limited to naive (CD27<sup>neg</sup>) B cells and undeniably discriminates them from transitional and memory B cells.<sup>57</sup> Moreover, the double MDR1/CD27 staining allows to delineate the switched and transitional B cells, the latter being CD27<sup>neg</sup>MDR1<sup>neg</sup>. The role of MDR1 on naive B cells is not yet established but could play a role in B cell migration like in



**Figure 2.** MDR1 expression in innate and adaptive immune cells in human.

MDR1 is widely expressed by immune cells from the innate (blue squares) and adaptive (red squares) compartments. MDR1 plays different role in maturation, migration and survival of the different subsets. Interestingly, it is tightly associated to specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes subsets expressing CD161 and secreting IL-17A.



DCs or in the lipid composition of their membrane, which is decisive for B cell activation.<sup>58</sup>

### *b T lymphocytes*

*i. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Pattern of MDR1 expression on CD4<sup>+</sup> T cells.* Pioneer studies on MDR1 in T lymphocytes have shown its expression on only half of CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>56</sup> In-depth MDR1 functional analysis based on CD45RA/CCR7 expression with Mitotracker green (MTG) dye,<sup>59</sup> showed that naive cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) exclude less MTG from their cytoplasm than CD4<sup>+</sup> effector (CD45RA<sup>neg</sup>CCR7<sup>neg</sup>, T<sub>EM</sub>) and central (CD45RA<sup>neg</sup>CCR7<sup>+</sup>, T<sub>CM</sub>) memory cells.<sup>60</sup> The majority of CD4<sup>+</sup> T cells expressing MDR1 are therefore memory cells with the exception of Treg (FoxP3<sup>+</sup> or CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup>) lacking MDR1 expression.<sup>60</sup> However, their described hyper-sensitivity to cyclophosphamide does not rely on that since this drug is not a MDR1 substrate.

**MDR1 association with Th17/Th1.17 features.** In healthy subjects, among CD4<sup>+</sup> memory T cells, MDR1 delineates a subset of effector T cells (Teff) mainly composed of Th1.17 also called pathogenic Th17.<sup>61</sup> Moreover, our team recently characterized, in human, the CD73<sup>+</sup> Teff population that is particularly enriched in Th1.17 and expressed higher MDR1 levels than their CD73<sup>neg</sup> counterpart.<sup>62</sup> A recent study also suggests that MDR1 is also selectively expressed by Teff bearing the lectin-like receptor CD161.<sup>63</sup> When analyzed in detail, it appears that this CD161<sup>+</sup>Rh123<sup>low</sup> (as a surrogate marker of MDR1) population has strong Th1.17 characteristics and that its high MDR1 expression could contribute to their long-term life span among virus-specific antigen memory T cell pool. This polyfunctional Teff population co-producing IFN- $\gamma$  and IL-17A and co-expressing MDR1, CD161 and CD73 might therefore be an interesting therapeutic target to modulate their pro-inflammatory features in auto-immune and tumor context.

**Functional impact of MDR1 expression on CD4<sup>+</sup> T cells.** In CD4<sup>+</sup> T cells, MDR1 seems to endorse several functions. It notably plays a role in their survival as shown in *in vitro* models of leukemic T cells made sensitive to caspase-dependent apoptosis after exposure to verapamil or anti-MDR1 mAb.<sup>64,65</sup> An alleged role for MDR1 in cytokine secretion by T lymphocytes was also suggested although it is not yet well-defined. Indeed, a study evidenced that this transporter is possibly involved in the export of several cytokines including IL-2, IL-4 and IFN $\gamma$ <sup>66</sup> whereas the use of MDR1-deficient mice didn't display IL-2 production defects, nor did human T cell lines KO for MDR1 expression.<sup>67</sup> Two major components of a chronically inflamed environment, detected in autoimmune disorders (IL-2 and fragmented hyaluronan), have been characterized as efficient activators of MDR1 expression by CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>68,69</sup> Considering this, recent works have proposed MDR1 blockade as a therapeutic strategy in autoimmune disorders or to limit allograft rejection.

*ii. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.* Contrary to CD4<sup>+</sup> T cells, most CD8<sup>+</sup> T cells exhibit a functional MDR1 identified by Rh123 assay, independently from their differentiation stage but with a significant association to their CD73 expression (unpublished

data). However, several studies have shed light on specific CD8<sup>+</sup> subsets expressing particularly high MDR1 levels in line with their functions. Recent work suggests that MDR1 is expressed in the bone marrow by a quiescent population of early memory CD8<sup>+</sup> T cells that proliferates efficiently *in vitro* in presence of viral peptides.<sup>70</sup> Turtle *et al.* also reported a memory CD8<sup>+</sup> T cell subset (IL18R $\alpha$ <sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD62L<sup>±</sup>) with high MDR1 expression endowed with stem cell properties and able to withstand high doses chemotherapy.<sup>71</sup> Recently, the expression of MDR1 has also been reported on circulating “young memory” cells (T<sub>YM</sub>) distinct from T<sub>CM</sub> and T<sub>EM</sub>, expressing CD73, CXCR3 and with a marked ALDH1 activity that could relate to cells with self-renewal properties able to survive high dose chemotherapy.<sup>72</sup>

Like NK cells, it has been shown that high MDR1 expression on CD8<sup>+</sup> T cells can contribute to their cytotoxic function<sup>73</sup> although no validating data have been published with recent tools available for MDR1 function study. Furthermore, there are no report of MDR1 inhibition affecting the pattern of cytokines secreted by CD8<sup>+</sup> T cells in contrast to that described by some teams on CD4<sup>+</sup> T cells.

*iii. Mucosal tissue associated T cells.* A CD161<sup>int</sup> MDR1<sup>hi</sup> memory CD8<sup>+</sup> T cell population was described as enriched in the gut, and caught up interest in the case of autoimmune Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC) treatment strategy.<sup>74</sup> In addition, xenobiotic resistance of mucosal-associated invariant T cells (MAIT) CD8<sup>+</sup> T cells (TCR V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>) has been associated to their MDR1 expression. These MAIT also express high levels of CD161 and secrete IL-17A or both IFN- $\gamma$  and IL-17A, displaying Tc17 and Tc1.17-like phenotypes.<sup>75</sup> Together with data discussed on CD4<sup>+</sup> Teff, these results suggest a common regulation of CD161 and MDR1 in T cells and a common pathway of development and related functions. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD161 might indeed share closer similarities in their respective ontogenic pathways than CD161<sup>neg</sup> counterparts.<sup>76</sup> CD161 expression by T lymphocytes has also been linked to their capacity to secrete IL-17A.<sup>77</sup> MDR1 expression might therefore be required for their proper function and to preserve them from toxins and xenobiotics particularly abundant in the intestine. In this matter, a recent work from Cao *et al.* using *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice shows that MDR1 initially plays a protective role in the gut since tissue resident MDR1 expressing CD4<sup>+</sup> Teff could resist better to bile acids and not induce inflammation while MDR1<sup>neg</sup> T cells would favor it.<sup>78</sup> Indeed, CD4<sup>+</sup> Teff from the ileum upregulate MDR1 expression in presence of bile acids to maintain homeostasis. First required as a protective mechanism for mucosal-associated T cells, MDR1 expression is therefore two-sided since it contributes to homeostasis but can become an obstacle to treatment in pathological contexts.

### **Part III- MDR1 expression on immune cells and its impacts in pathologies and therapeutic strategies**

Since MDR1 is widely expressed throughout the immune system, multiple evidences suggest it contributes to modulate the action of some drugs as well as the response or resistance of patients to treatments in various pathologies. We review

the known consequences of MDR1 expression on immune cells in several human systemic autoimmune disorders, as well as in the context of viral infection (HIV) and anti-tumor immune response.

### 1- Auto-immune diseases

**a Rheumatoid autoimmune disorders: rheumatoid arthritis (RA) and psoriatic arthritis (PsA).** T cell hyper activation and resistance to Treg inhibition play a central role in rheumatoid autoimmune diseases including RA and PsA. In blood of RA patients with highly active disease, high MDR1 expression has been evidenced on memory B cells, involved in the physiopathology of the disease.<sup>79</sup> This strongly contrasts with the MDR1 expression restricted on naïve B cells observed in healthy donors.<sup>57</sup> The most commonly used treatments in RA and PsA rely on synthetic disease modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) like methotrexate (MTX), sulfasalazine (SSZ), leflunomide (LEF) or glucocorticoids (GC). GC are substrates of MDR1 and have a direct influence on patient response over time. Moreover, increased MDR1 functionality on T cells from RA patients treated with prednisolone was reported in 1996.<sup>80</sup> It highlighted the role that MDR1 could play in resistance of T cells to DMARDs. Despite contradictory data in the literature, MTX is not a substrate of MDR1 but of MRP1.<sup>81</sup> Under MTX treatment, MDR1 expression might therefore not be a resistance factor but rather reflect disease activity.<sup>82</sup> Strategies combining drugs that are not substrates of MDR1 (e.g., MTX, infliximab) with MDR1 inhibition by tacrolimus partially restored response to treatment in refractory RA patients and decrease MDR1 expression on both T and B lymphocytes.<sup>79</sup>

Recently, *ABCB1* SNPs (G2677A/T, and less significantly C1236T and C3435T) have been associated with good prognosis in RA patients treated with GC since they reduce MDR1 function on B cells and to a lesser extent on other PBMCs, thus lowering GC resistance.<sup>83</sup>

### b Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)

Gut tissues are naturally enriched with Th17 and Th1.17, due to chronic exposure of T cells to many pathogens as well as to a pro-inflammatory cytokine-rich environment (IL-17A, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), stimulating their differentiation. A tolerance break induced by uncontrolled chronic stimulation of these immune cells is the starting point to UC and CD pathogenesis. Th17 and Th1.17 are particularly active in the pathogenesis of these affections and Ramesh *et al.* demonstrated, in CD patients, a MDR1 enrichment within Th1.17 that resist to GC treatment.<sup>61</sup> On the contrary, MDR1 loss of function was identified in a subset of patients with an aggressive form of ileal CD.<sup>78</sup> Therefore, MDR1 role is dual in this pathology. It plays a protective role at first, but its loss can lead to a breach in homeostasis and favor the disease progression. In other cases, where loss of homeostasis involves other mechanisms, MDR1 expression can favor the selection of treatment-resistant T cells thereafter active in the pathophysiology of the diseases. In addition, *ABCB1* SNPs (G2677T/A and C3435T) are associated with refractory UC and CD and might play a role in the resistance of T cells to GC treatment.<sup>84</sup> Their good

or poor prognosis could depend on the cases depicted above indicating that either MDR1 loss of function or over-expression can lead to the same phenotype depending on the pathophysiological mechanisms primarily involved.

Altogether, these data related to MDR1 impact on disease course and treatment are strong arguments to personalized therapy for patients with autoimmune disorders. Efforts should also be done on the evaluation of MDR1 expression and function in the different immune subsets involved in autoimmune diseases to better understand the roles it can play in disease course and response to treatment.

### 2- HIV treatment and resistance

As described in Table 1, MDR1 can exclude protease inhibitor (PI) used to treat HIV infected patients, thus conferring treatment resistances.<sup>85</sup> MDR1 polymorphisms, especially the T variant of the C1236T SNP, increase affinity for some PI resulting in a low intestinal absorption and an increased PI efflux by CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>86</sup> Moreover, PI concentrations in PBMC from HIV infected patients inversely correlate with mRNA levels of *ABCB1* in the cells<sup>85</sup>, suggesting the implication of MDR1 in HIV treatment resistances.

The proportions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expressing MDR1 are higher in HIV infected patients than in healthy controls and seem to increase during the progression of the infection. Nonetheless, MDR1 functionality is reduced in HIV patients as illustrated by a higher intracellular accumulation of Rh123 compared to controls that is not altered by cyclosporin-A.<sup>87</sup> Furthermore, this altered MDR1 functionality is also observed on patients' NK cells as it increases with the progression of the infection and correlates with a decrease of their cytotoxic functions.<sup>88</sup> However, this impairment seems to be transient and shaped by the environment as the *in vitro* stimulation of these NK cells with IL-15 restores MDR1 functionality as well as NK cell cytotoxic functions.<sup>89</sup> In contrast, the increased MDR1 expression at transcriptomic and protein levels detected on CD8<sup>+</sup> T cells in treated patients is associated with a better efflux capacity.<sup>90</sup>

Concerning M $\phi$ , M2-M $\phi$  express higher MDR1 levels than M1-M $\phi$  and their increased efflux of lopinavir favor the accumulation of latent virus.<sup>46</sup>

Altogether, these data suggest that the evaluation of MDR1 expression on some immune subsets might be relevant to assess the state of disease development or guide the therapeutic option in HIV infected patients.

### 3- Anti-cancer drugs and impact on immune cells

In the cancer field, two scenarios can be distinguished when studying MDR1 expression and function on immune cells. Either the malignant cells are immune cells, originally expressing or not MDR1, or the immune cells infiltrate solid tumors from other tissue origin. We consider both cases showing the alternatives of treatment and the challenges it raises.

**a MDR1 expression in T leukemic cells, lymphomas and myelomas.** Many immune cell types giving rise to hematological malignancies naturally express MDR1 as described previously (B cells, T cells, myeloid cells). Therefore, emerging hematological tumors are often resistant to chemotherapies

that are MDR1 substrates. AML or multiple myelomas (MM) patients displaying high MDR1 expression on malignant cells indeed show poorer response to many treatments compared to patients with lower MDR1 expression.<sup>91–93</sup> This natural expression by myeloid and lymphoid cells is also strengthened by oncogenic mechanisms inducing aberrant MDR1 re-expression on cell types normally MDR1<sup>neg</sup> (e.g., memory B cells) such as Diffuse Large B Cell lymphoma (DLBCL) and Follicular Lymphoma (FL) or enhancing preexisting MDR1 expression (e.g., naïve and transitory B cells, monocytes). Indeed, upregulation of *ABCB1* is related to hyper activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway that activates YB-1 nuclear translocation and this amplification loop is increased in B-cell lymphomas.<sup>94</sup> To improve treatment efficacy, combination of MDR1 inhibitors with specific drugs have been tested, showing notably encouraging results in term of overall survival in patients with AML.<sup>22,95–97</sup> Most of these studies used first or second generation inhibitors. The use of much more specific third or upcoming fourth generation inhibitors could allow to improve these results and decrease toxicities associated with combination treatments. Interestingly, MDR1-induced chemo-resistance in lymphoma cells can be overcome with anti-CD20 as well as anti-CD19 mAbs used in lymphoma therapy. In addition to their therapeutic effect based on complement-mediated and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, both mAbs, could increase chemotherapy efficacy, by limiting MDR1 activity as fixation to their target could favor MDR1 re-localization outside of the lipid rafts where it is much less efficient.<sup>98,99</sup> More recently, PI substrates of MDR1 have also been used as unconventional competitive inhibitors in MM to improve efficacy of carfilzomib (proteasome inhibitor).<sup>93</sup> Understanding MDR1 regulation processes in normal and neoplastic immune cells therefore appears as an interesting lead to improve combination therapy options in hematological tumors and discover new molecules efficiently blocking MDR1 activity with limited side effects.

**b MDR1 expression on immune infiltrate in tumors.** MDR1 has been extensively studied on tumor cells along with the phenomenon of multidrug resistance. However, little is known on the role of MDR1 on the tumor immune infiltrate. Could MDR1 expression by specific lymphocytes or NK cells represent an interesting mechanism of shaping of the immune infiltrate in solid tumors? The data we report here suggest that all immune cells do not respond the same way when exposed to MDR1-sensitive drugs. It is therefore highly likely that the infiltrate will be shaped upon such treatment regimen.

#### **Presence of MDR1 positive T cells in solid tumors infiltrates**

Very few data are so far available on the evaluation of MDR1 expression by the immune infiltrate and its possible impact on immune cells survival in solid tumors. A recent study, conducted on advanced human colorectal cancer (CRC) tissues showed, a significant higher frequency of MDR1<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells, considered mostly as MAIT cells by the authors, in the tumor tissue compared to adjacent healthy tissues.<sup>100</sup> In this matter, evaluation of MDR1 expression by immune subtypes should be more extensively investigated.

The hostile tumor micro-environment and its chemical composition must indeed shape the immune infiltrate, and MDR1 expression by anti-tumor immune cells may favor their preservation despite harsh environmental conditions. The immune infiltrate is also modulated by MDR1-associated anti-neoplastic agents,<sup>90,101</sup> and evaluation of MDR1 level on immune cells could be an indicator of these treatments' effects.

#### **Tumor-associated immune infiltrate could be skewed by the use of chemotherapies substrates of MDR1**

It is expected that MDR1-expressing immune cells in the tumor microenvironment will resist better to MDR1-associated chemotherapies. The Th1.17 subset expressing high MDR1 level and also secreting pro-inflammatory cytokines,<sup>61,62</sup> appears as an asset in the anti-tumor immune response in contrast to its deleterious impact in autoimmune diseases. In long term chemotherapy treated AML patients, the non-malignant CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> T cells fraction is increased, and they conserve their anti-viral properties and display self-renewal capacities.<sup>63</sup> In addition, we showed an enrichment in MDR1-positive cells within CD4<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> Teff infiltrating breast and ovarian carcinomas (unpublished data) that secrete anti-tumor cytokines (IFN $\gamma$ , IL-17A, TNF $\alpha$ ) *ex vivo* in the absence of adenosine or ATP/AMP.<sup>62</sup> In addition, we evidenced that this specific subset expresses very low level of inhibitory immune checkpoints like PD-1 and CTLA-4. This highly polyfunctional CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff population might therefore be of interest in therapeutic approaches combining MDR1-associated chemotherapy and anti-CD73 targeting therapy to avoid adenosine production and potentiate pro-inflammatory response of this specific subset. Moreover, determining which IL-17A secreting immune cells express MDR1 in the tumor microenvironment could help solve the controversial role played by IL-17A in solid tumors. Enrichment of the specific Th1.17 subset at the tumor site subsequently to the use of MDR1-associated chemotherapy may indeed favor anti-tumor properties of IL-17A. We can also predict curtailment of the Treg frequency since their lack of MDR1 will increase their sensitivity to high doses of these treatments. Considering the M $\phi$ , we can on the contrary expect a skewing towards pro-tumoral M2-M $\phi$  upon high doses chemotherapy since they express higher levels of MDR1. NK cells are also key players in the anti-tumor immune response, and quantitative but also functional alteration of NK cells in primary and metastatic tumors have been evidenced.<sup>102</sup> Since NK cells were shown to express high levels of MDR1 in physiological context it would be worthwhile evaluating MDR1 expression on the NK infiltrate in tumor environment and determine if it correlates with tumor destruction or if therapeutic choices influence positively or negatively NK cell cytotoxicity.

In the case of poorly chemo-resistant tumors displaying low MDR1 activity like breast tumors,<sup>103</sup> the use of high doses of MDR1-associated chemotherapeutic agents, could therefore have a double advantage: it should be effective against tumor cells to a certain extent favoring the release of tumor antigens and could also induce the selection of immune subsets with interesting anti-tumor features (Th1.17, CD161<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells), while limiting MDR1<sup>neg</sup> Treg expansion. However,

one should keep in mind that this selection could also favor pro-tumor M2-Mφ expansion in the tumor since they express MDR1 at high level.

On the contrary, the use of MDR1 inhibitors in combination treatment of chemo-resistant solid tumors may help restore chemo-sensitivity of tumor cells but could in the same time impair critical anti-tumor T cell populations. Changes induced by such treatment on immune infiltrate must especially be considered in the therapeutic strategy to anticipate variations of the immune players at the tumor site to try to achieve the most efficient anti-tumor response.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr. L.P. Jordheim for critical reading of the manuscript.

## Funding

This work has been financially supported by the Breast Cancer Research Foundation (BCRF), grants from the Puy de Dôme comity of the “Ligue Contre le Cancer”, the SIRIC project (LyriCAN, grant n°INCa-DGOS-INSERM\_12563), the FP7 European TumAdoR project (grant n° 602200) and the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of the University of Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” organized by the French National Research Agency (ANR). We also acknowledge the “Ligue Nationale contre le Cancer” for A Di-Roio PhD fellowship.

## References

- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:537–592. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055.
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(1):3–29. doi:10.1016/S0169-409X(02)00169-2.
- Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, Shimizu K. Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer Invest.* 2009. 27(9):901–908. doi:10.3109/07357900801946679.
- Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in human cancer cells. *New J Sci.* 2014 accessed 2018 Mar 23. doi:10.1155/2014/476974.
- Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem.* 1992;267(34):24248–24252.
- Bello-Reuss E, Ernest S, Holland OB, Hellmich MR. Role of multidrug resistance P-glycoprotein in the secretion of aldosterone by human adrenal NCI-H295 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000. 278(6):C1256–1265. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.6.C1256.
- Kuhnke D, Jedlitschky G, Grube M, Krohn M, Jucker M, Mosyagin I, Cascorbi I, Walker LC, Kroemer HK, Warzok RW, et al. MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer’s amyloid-beta peptides—implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol.* 2007;17(4):347–353. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00075.x.
- Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J.* 2005. 7(1):E1–5. doi:10.1208/aapsj070101.
- Hrycyna CA, Ramachandra M, Ambudkar SV, Ko YH, Pedersen PL, Pastan I, Gottesman MM. Mechanism of action of human P-glycoprotein ATPase activity. Photochemical cleavage during a catalytic transition state using orthovanadate reveals cross-talk between the two ATP sites. *J Biol Chem.* 1998;273(27):16631–16634. doi:10.1074/jbc.273.27.16631.
- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science.* 2009;323(5922):1718–1722. doi:10.1126/science.1168750.
- Kajiji S, Talbot F, Grizzuti K, Van Dyke-Phillips V, Agresti M, Safa AR, Gros P. Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry.* 1993;32(16):4185–4194. doi:10.1021/bi00067a005.
- Hafkemeyer P, Dey S, Ambudkar SV, Hrycyna CA, Pastan I, Gottesman MM. Contribution to substrate specificity and transport of nonconserved residues in transmembrane domain 12 of human P-glycoprotein. *Biochemistry.* 1998. 37(46):16400–16409. doi:10.1021/bi980871+.
- Loo TW, Clarke DM. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol.* 2005. 206(3):173–185. doi:10.1007/s00232-005-0792-1.
- Raggers RJ, Vogels I, van Meer G. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem J.* 2001;357(Pt 3):859–865. doi:10.1042/bj3570859.
- Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011. 21(3):152–161. doi:10.1097/FPC.0b013e3283385a1c.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene.* 2003. 22(47):7340–7358. doi:10.1038/sj.onc.1206938.
- Chen Z-S, Tiwari AK. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in Cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J.* 2011. 278(18):3226–3245. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08235.x.
- Gow JM, Hodges LM, Chinn LW, Kroetz DL. Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008. 325(2):435–442. doi:10.1124/jpet.107.135194.
- Akbas SH, Bilgen T, Keser I, Tuncer M, Yucetin L, Tosun O, Gultekin M, Luleci G. The effect of MDR1 (ABCB1) polymorphism on the pharmacokinetic of tacrolimus in Turkish renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006. 38(5):1290–1292. doi:10.1016/j.transproceed.2006.02.079.
- Vafadari R, Bouamar R, Hesselink DA, Kraaijeveld R, van Schaik RHN, Weimar W, Baan CC, van Gelder T. Genetic polymorphisms in ABCB1 influence the pharmacodynamics of tacrolimus. *Ther Drug Monit.* 2013. 35(4):459–465. doi:10.1097/FTD.0b013e31828c1581.
- Amin ML. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights.* 2013;7:27–34. doi:10.4137/DTI.S12519.
- Tang R, Faussat A-M, Perrot J-Y, Marjanovic Z, Cohen S, Storme T, Morjani H, Legrand O, Marie J-P. Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML). *BMC cancer.* 2008;8:51. doi:10.1186/1471-2407-8-51.
- Ri S, Cao J, Jj S, Ah D. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int J Cancer.* 2003. 103(1):121–125. doi:10.1002/ijc.10792.
- Wu C-P, Ohnuma S, Ambudkar SV. Discovering natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(4):609–620. doi:10.2174/138920111795163887.
- Karthikeyan S, Hoti SL. Development of fourth generation ABC inhibitors from natural products: a novel approach to overcome cancer multidrug resistance. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(5):605–615. doi:10.2174/1871520615666150113103439.
- Mickisch GH, Pai LH, Gottesman MM, Pastan I. Monoclonal antibody MRK16 Reverses the multidrug resistance of multidrug-resistant transgenic mice. *Cancer Res.* 1992;52(16):4427–4432.

27. Mechetner EB, Roninson IB. Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci*. 1992. 89(13):5824–5828. doi:10.1073/pnas.89.13.5824.
28. Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Z, Nagy H, Márián T, Megyeri A, Krasznai Z, Juhász I, Vecsernyés M, Szabó G. Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007. 320(1):81–88. doi:10.1124/jpet.106.110155.
29. Chambers TC, Pohl J, Glass DB, Kuo JF. Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem J*. 1994;299(Pt 1):309–315. doi:10.1042/bj2990309.
30. Wojtal KA, De Vries E, Hoekstra D, van Ijzendoorn SCD. Efficient trafficking of MDR1/P-glycoprotein to apical canalicular plasma membranes in HepG2 cells requires PKA-RIIalpha anchoring and glucosylceramide. *Mol Biol Cell*. 2006. 17(8):3638–3650. doi:10.1091/mbc.E06-03-0230.
31. Garrigues A, Escargueil AE, Orlowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(16):10347–10352. doi:10.1073/pnas.162366399.
32. Rothnie A, Theron D, Soceneantu L, Martin C, Traikia M, Berridge G, Higgins CF, Devaux PF, Callaghan R. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. *European biophysics journal: EBJ*. 2001;30(6):430–442.
33. Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol*. 2004. 66(5):1332–1339. doi:10.1124/mol.104.002329.
34. Luker GD, Pica CM, Kumar AS, Covey DF, Piwnica-Worms D. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains. *Biochemistry*. 2000;39(26):7651–7661. doi:10.1021/bi9928593.
35. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*. 2002;62(12):3387–3394.
36. Seebacher NA, Richardson DR, Jansson PJ. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics. *Br J Pharmacol*. 2015. 172(10):2557–2572. doi:10.1111/bph.13079.
37. Pinzón-Daza ML, Cuellar-Saenz Y, Nualart F, Ondo-Mendez A, Del Riesgo L, Castillo-Rivera F, Garzón R. Oxidative stress promotes doxorubicin-induced Pgp and BCRP expression in colon cancer cells under hypoxic conditions. *J Cell Biochem*. 2017. 118(7):1868–1878. doi:10.1002/jcb.25890.
38. Feng -D-D, Zhang H, Zhang P, Zheng Y-S, Zhang X-J, Han B-W, Luo X-Q, Xu L, Zhou H, Qu L-H, et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(10):2164–2175. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01213.x.
39. Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 2013. 83(2):399–405. doi:10.1124/mol.112.081844.
40. Zhu X, Li Y, Shen H, Li H, Long L, Hui L, Xu W. miR-137 restoration sensitizes multidrug-resistant MCF-7/ADM cells to anticancer agents by targeting YB-1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013. 45(2):80–86. doi:10.1093/abbs/gms099.
41. Dolfini D, Mantovani R. Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? *Cell Death Differ*. 2013. 20(5):676–685. doi:10.1038/cdd.2013.13.
42. Devault A, Gros P. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol*. 1990;10(4):1652–1663. doi:10.1128/MCB.10.4.1652.
43. Eisenbraun MD, Mosley RL, Teitelbaum DH, Miller RA. Altered development of intestinal intraepithelial lymphocytes in P-glycoprotein-deficient mice. *Dev Comp Immunol*. 2000. 24(8):783–795. doi:10.1016/S0145-305X(00)00029-X.
44. Tanner SM, Staley EM, Lorenz RG. Altered generation of induced regulatory T cells in the FVB.*mdr1a*<sup>-/-</sup> mouse model of colitis. *Mucosal Immunol*. 2013. 6(2):309–323. doi:10.1038/mi.2012.73.
45. Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gattlinger C, Huber H, Andreeff M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype [see comments]. *Blood*. 1992;80(11):2729–2734.
46. Cory TJ, He H, Winchester LC, Kumar S, Fletcher CV. Alterations in P-glycoprotein expression and function between macrophage subsets. *Pharm Res*. 2016. 33(11):2713–2721. doi:10.1007/s11095-016-1998-x.
47. Liu J, Zhou F, Chen Q, Kang A, Lu M, Liu W, Zang X, Wang G, Zhang J. Chronic inflammation up-regulates P-gp in peripheral mononuclear blood cells via the STAT3/Nf-kb pathway in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis mice. *Sci Rep*. 2015;5:13558. doi:10.1038/srep13558.
48. Puddu P, Fais S, Luciani F, Gherardi G, Dupuis ML, Romagnoli G, Ramoni C, Cianfriglia M, Gessani S. Interferon-gamma up-regulates expression and activity of P-glycoprotein in human peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Lab Invest*. 1999;79(10):1299–1309.
49. Pendse SS, Behjati S, Schatton T, Izawa A, Sayegh MH, Frank MH. P-glycoprotein functions as a differentiation switch in antigen presenting cell maturation. *Am J Transplant*. 2006. 6(12):2884–2893. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01561.x.
50. Laupèze B, Amiot L, Bertho N, Grosset JM, Lehne G, Fauchet R, Fardel O. Differential expression of the efflux pumps P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in human monocyte-derived dendritic cells. *Hum Immunol*. 2001;62(10):1073–1080.
51. Ishri RK, Menzies S, Halliday GM. Verapamil induces upregulation of P-glycoprotein expression on human monocyte derived dendritic cells. *Immunol Invest*. 2006. 35(1):1–18. doi:10.1080/08820130500496746.
52. Vasquez EM, Petrenko Y, Jacobssen V, Sifontis NM, Testa G, Sankary H, Benedetti E. An assessment of P-glycoprotein expression and activity in peripheral blood lymphocytes of transplant candidates. *Transplant Proc*. 2005. 37(1):175–177. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.018.
53. Ludescher C, Pall G, Irschick EU, Gastl G. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br J Haematol*. 1998;101(4):722–727.
54. Yamashiro T, Watanabe N, Kobayashi Y. Reduction of intracellular pH by inhibitors of natural killer cell activity, nicardipine, methyl 2-(N-benzyl-N-methylamino)ethyl-2,6-dimethyl-4-(2-isopropyl-pyrazolo[1, 5-a]pyridine-3-yl)-1,4-dihydro-pyridine-3,5-dicarboxylate (AHC-52), and 4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid stilbene (DIDS). *Biochem Pharmacol*. 1997;54(1):143–148.
55. Takahashi M, Misawa Y, Watanabe N, Kawanishi T, Tanaka H, Shigenobu K, Kobayashi Y. Role of P-glycoprotein in human natural killer-like cell line-mediated cytotoxicity. *Exp Cell Res*. 1999. 253(2):396–402. doi:10.1006/excr.1999.4696.
56. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*. 1991. 66(1):85–94. doi:10.1016/0092-8674(91)90141-K.
57. Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*. 2005. 35(12):3433–3441. doi:10.1002/eji.200535364.
58. Yagi K, Yamamoto K, Umeda S, Abe S, Suzuki S, Onishi I, Kirimura S, Fukayama M, Arai A, Kitagawa M, et al. Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association

- with follicular dendritic cells. *Histopathology*. 2013;62(3):414–420. doi:10.1111/his.12035.
59. Marques-Santos LF, Oliveira JGP, Maia RC, Rumjanek VM. Mitotracker green is a emphasis Type="Italic" P emphasis-glycoprotein substrate. *Biosci Rep*. 2003. 23(4):199–212. doi:10.1023/B:BIRE.0000007693.33521.18.
  60. Sarah D, Corina F, Marco F, Gubser Patrick M, Leyla R, Bantug Glenn R, Morgane R, Anja L, Christoph H. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. *Eur J Immunol*. 2014. 44(12):3614–3620. doi:10.1002/eji.201444879.
  61. Ramesh R, Kozhaya L, McKeivitt K, Djuretic IM, Carlson TJ, Quintero MA, McCauley JL, Abreu MT, Unutmaz D, Sundrud MS. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med*. 2014. 211(1):89–104. doi:10.1084/jem.20130301.
  62. Gourdin N, Bossennec M, Rodriguez C, Viganò S, Machon C, Jandus C, Bauché D, Faget J, Durand I, Chopin N, et al. Autocrine Adenosine regulates tumor polyfunctional CD73+CD4+ effector T cells devoid of immune checkpoints. *Cancer Res*. 2018Mar20 doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2405.
  63. Alsuliman A, Muftuoglu M, Khoder A, Ahn Y-O, Basar R, Verneris MR, Muranski P, Barrett AJ, Liu E, Li L, et al. A subset of virus-specific CD161+ T cells selectively express the multidrug transporter MDR1 and are resistant to chemotherapy in AML. *Blood*. 2017;129(6):740–758. doi:10.1182/blood-2016-05-713347.
  64. Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. P-Glycoprotein Protects Leukemia Cells Against Caspase-Dependent, but not Caspase-Independent, Cell Death. *Blood*. 1999;93(3):1075–1085.
  65. Gollapudi S, Gupta S. Anti-P-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of P-glycoprotein in lymphocyte survival. *J Clin Immunol*. 2001;21(6):420–430. doi:10.1023/A:1013177710941.
  66. Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M, et al. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood*. 1996;88(5):1747–1754.
  67. Gollapudi S, Kim C, Gupta S. P-glycoprotein (encoded by multidrug resistance genes) is not required for interleukin-2 secretion in mice and humans. *Genes Immun*. 2000. 1(6):371–379. doi:10.1038/sj.gene.6363693.
  68. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K, Tsukada J, Kohno K, Tanaka Y. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells: Devoted Mol Cell Mech*. 2004. 9(12):1265–1273. doi:10.1111/j.1365-2443.2004.00803.x.
  69. Tsujimura S, Saito K, Kohno K, Tanaka Y. Fragmented hyaluronan induces transcriptional up-regulation of the multidrug resistance-1 gene in CD4+ T cells. *J Biol Chem*. 2006. 281(49):38089–38097. doi:10.1074/jbc.M61030200.
  70. Kudernatsch RF, Letsch A, Guerreiro M, Löbel M, Bauer S, Volk H-D, Scheibenbogen C. Human bone marrow contains a subset of quiescent early memory CD8+ T cells characterized by high CD127 expression and efflux capacity. *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3532–3542. doi:10.1002/eji.201344180.
  71. Turtle CJ, Swanson HM, Fujii N, Estey EH, Riddell SR, Distinct A. Subset of self-renewing human memory CD8+ T cells survives cytotoxic chemotherapy. *Immunity*. 2009. 31(5):834–844. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.015.
  72. Murata K, Tsukahara T, Emori M, Shibayama Y, Mizushima E, Matsumiya H, Yamashita K, Kaya M, Hirohashi Y, Kanaseki T, et al. Identification of a novel human memory T-cell population with the characteristics of stem-like chemo-resistance. *Oncotarget*. 2016;5(6):e1165376. doi:10.1080/2162402X.2016.1165376.
  73. Gupta S, Kim CH, Tsuruo T, Gollapudi S. Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: A role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol*. 1992. 12(6):451–458. doi:10.1007/BF00918857.
  74. Fergusson JR, Hühn MH, Swadling L, Walker LJ, Kurioka A, Llibre A, Bertoletti A, Holländer G, Newell EW, Davis MM, et al. CD161(int)CD8+ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8+ T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol*. 2016;9(2):401–413. doi:10.1038/mi.2015.69.
  75. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Bourhis LL, Soudais C, Treiner E, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood*. 2011;117(4):1250–1259. doi:10.1182/blood-2010-08-303339.
  76. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol*. 2011;2:36. doi:10.3389/fimmu.2011.00036.
  77. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*. 2008;205(8):1903–1916. doi:10.1084/jem.20080397.
  78. Cao W, Kayama H, Chen ML, Delmas A, Sun A, Kim SY, Rangarajan ES, McKeivitt K, Beck AP, Jackson CB, et al. The xenobiotic transporter mdr1 enforces T Cell homeostasis in the presence of intestinal bile acids. *Immunity*. 2017;47(6):1182–1196. e10. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.012.
  79. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tanaka Y. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008. 67(3):380–388. doi:10.1136/ard.2007.070821.
  80. Maillefert JF, Maynadie M, Tebib JG, Aho S, Walker P, Chatard C, Dulieu V, Bouvier M, Carli PM, Tavernier C. Expression of the multidrug resistance glycoprotein 170 in the peripheral blood lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. The percentage of lymphocytes expressing glycoprotein 170 is increased in patients treated with prednisolone. *Br J Rheumatol*. 1996;35(5):430–435. doi:10.1093/rheumatology/35.5.430.
  81. Maillefert J-F, Puéchal X, Falgarone G, Lizard G, Ornetti P, Solau E, Legré V, Lioté F, Sibilia J, Morel J, et al. Prediction of response to disease modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2010;77(6):558–563. doi:10.1016/j.jbspin.2010.02.018.
  82. Agarwal V, Mittal SK, Misra R. Expression of multidrug resistance-1 protein correlates with disease activity rather than the refractoriness to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2009. 28(4):427–433. doi:10.1007/s10067-008-1071-1.
  83. Cuppen BVJ, Pardali K, Kraan MC, Marijnissen ACA, Yrlid L, Olsson M, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Fritsch-Stork RDE. Polymorphisms in the multidrug-resistance 1 gene related to glucocorticoid response in rheumatoid arthritis treatment. *Rheumatol Int*. 2017. 37(4):531–536. doi:10.1007/s00296-017-3653-1.
  84. Brinar M, Cukovic-Cavka S, Bozina N, Ravic KG, Markos P, Ladic A, Cota M, Krznaric Z, Vucelic B. MDR1 polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients. *BMC Gastroenterol*. 2013;13:57. doi:10.1186/1471-230X-13-57.
  85. Chaillou S, Durant J, Garraffo R, Georgenthum E, Roptin C, Clevenbergh P, Dunais B, Mondain V, Roger PM, Dellamonica P. Intracellular concentration of protease inhibitors in HIV-1-infected patients: correlation with MDR-1 gene expression and low dose of ritonavir. *HIV Clin Trials*. 2002. 3(6):493–501. doi:10.1310/hct.2002.3.6.007.
  86. Bellusci CP, Rocco C, Aulicino P, Mecikovsky D, Curras V, Hegoburu S, Bramuglia GF, Bologna R, Sen L, Mangano A. Influence of MDR1 C1236T polymorphism on lopinavir plasma concentration and virological response in HIV-1-infected children. *Gene*. 2013. 522(1):96–101. doi:10.1016/j.gene.2013.03.020.
  87. Andreana A, Aggarwal S, Gollapudi S, Wien D, Tsuruo T, Gupta S. Abnormal expression of a 170-kilodalton P-glycoprotein

- encoded by MDR1 gene, a metabolically active efflux pump, in CD4+ and CD8+ T cells from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996. 12(15):1457–1462. doi:10.1089/aid.1996.12.1457.
88. Lucia MB, Cauda R, Malorni W, Rainaldi G, Tumbarello M, Tacconelli E, Rumi C, Donelli G, Ortona L. P-170 glycoprotein (P-170) is involved in the impairment of natural killer cell-mediated cytotoxicity in HIV+ patients. *Immunol Lett*. 1995;47(3):223–226.
  89. Chang KH, Kim JM, Yoo NC, Kim WH, Park JH, Choi IH, Kim HS, Lee KW, Song YG, Hong SK, et al. Restoration of P-glycoprotein function is involved in the increase of natural killer activity with exogenous interleukin-15 in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Yonsei Med J*. 2000;41(5):600–606. doi:10.3349/ymj.2000.41.5.600.
  90. Zhang J-C, Xie F, Yu X-H, Deng Z-Y, Wang Y, Liang P, Sun L, Zhang F-X. Expression levels of P-glycoprotein in peripheral blood CD8+ T lymphocytes from HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. *Int J Mol Med*. 2014. 33(2):431–440. doi:10.3892/ijmm.2013.1584.
  91. Brophy NA, Marie JP, Rojas VA, Warnke RA, McFall PJ, Smith SD, Sikic BI. Mdr1 gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemias and lymphomas: a critical evaluation by four techniques. *Leukemia*. 1994;8(2):327–335.
  92. Zenkov AN, Scvortsova NV, Chernolovskaya EL, Pospelova TI, Vlassov VV. Expression of the MDR1 and MRP genes in patients with lymphoma with primary bone marrow involvement. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004. 23(6–7):843–847. doi:10.1081/NCN-200026029.
  93. Besse A, Stolze SC, Rasche L, Weinhold N, Morgan GJ, Kraus M, Bader J, Overkleef HS, Besse L, Driessen C. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018. 32(2):391–401. doi:10.1038/leu.2017.212.
  94. Shen H, Xu W, Luo W, Zhou L, Yong W, Chen F, Wu C, Chen Q, Han X. Upregulation of mdr1 gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma. *Exp Hematol*. 2011. 39(5):558–569. doi:10.1016/j.exphem.2011.01.013.
  95. List AF, Spier C, Greer J, Wolff S, Hutter J, Dorr R, Salmon S, Futscher B, Baier M, Dalton W. Phase I/II trial of cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifier in acute leukemia. *J Clin Oncol*. 1993. 11(9):1652–1660. doi:10.1200/JCO.1993.11.9.1652.
  96. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 2001;98(12):3212–3220. doi:10.1182/blood.V98.12.3212.
  97. Greenberg PL, Lee SJ, Advani R, Tallman MS, Sikic BI, Letendre L, Dugan K, Lum B, Chin DL, Dewald G, et al. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine with or without valspodar in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III Trial (E2995). *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1078–1086. doi:10.1200/JCO.2004.07.048.
  98. Ghetie M-A, Marches R, Kufert S, Vitetta ES. An anti-CD19 antibody inhibits the interaction between P-glycoprotein (P-gp) and CD19, causes P-gp to translocate out of lipid rafts, and chemosensitizes a multidrug-resistant (MDR) lymphoma cell line. *Blood*. 2004. 104(1):178–183. doi:10.1182/blood-2003-12-4255.
  99. Ghetie M, Crank M, Kufert S, Pop I, Vitetta E. Rituximab but not Other anti-cd20 Antibodies Reverses Multidrug Resistance in 2 B lymphoma Cell Lines, Blocks the Activity of P-glycoprotein (p-gp), and Induces P-gp to Translocate out of Lipid Rafts. *J Immunotherapy*. 2006. 29(5):536–544. doi:10.1097/01.cji.0000211307.05869.6c.
  100. Ling L, Lin Y, Zheng W, Hong S, Tang X, Zhao P, Li M, Ni J, Li C, Wang L, et al. Circulating and tumor-infiltrating mucosal associated invariant T (MAIT) cells in colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:20358. doi:10.1038/srep20358.
  101. Panis C, Lemos LGT, Victorino VJ, Herrera ACSA, Campos FC, Colado Simão AN, Pinge-Filho P, Cecchini AL, Cecchini R. Immunological effects of taxol and adriamycin in breast cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2012. 61(4):481–488. doi:10.1007/s00262-011-1117-0.
  102. Verronèse E, Delgado A, Valladeau-Guilemond J, Garin G, Guillemaut S, Tredan O, Ray-Coquard I, Bachelot T, N’Kodia A, Bardin-Dit-Courageot C, et al. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay. *Oncoimmunology*. 2015;5:3. doi:10.1080/2162402X.2015.1100791.
  103. Hegewisch-Becker S, Staib F, Löning T, Pichlmeier U, Kröger N, Reymann A, Hossfeld DK. No evidence of significant activity of the multidrug resistance gene product in primary human breast cancer. *Ann Oncology: Off J Eur Soc Med Oncol*. 1998;9(1):85–93. doi:10.1023/A:1008255725515.

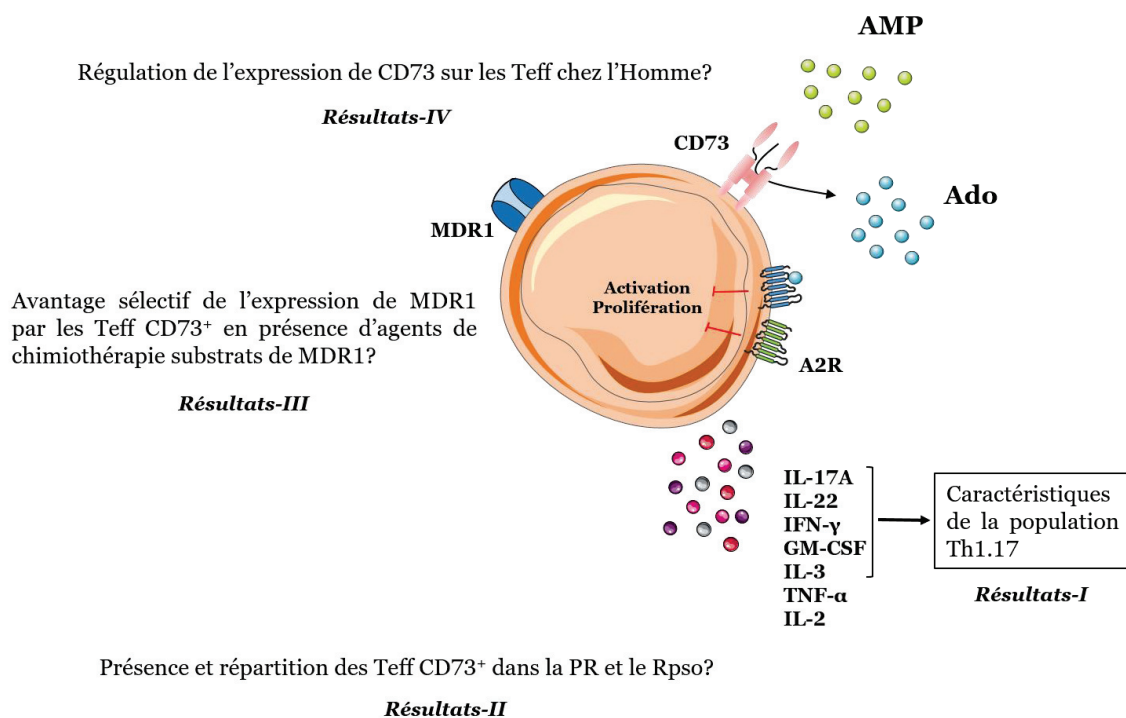






**Problématique centrale** : Identification et implication des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> en contextes physiologique et pathologique.  
Mécanismes de régulation.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à plusieurs facettes de cette population de LTCD4 polyfonctionnels exprimant l'ecto-nucléotidase CD73 et présentant des propriétés singulières. Je développe chaque aspect dans les résultats qui suivent en présentant tout d'abord la caractérisation de cette population en contexte physiologique et son investigation dans le contexte tumoral qui a fait l'objet d'une publication dans Cancer Research (**Résultats-I**). J'étudie également l'implication de cette population dans un contexte d'auto-immunité dans deux pathologies (RA et RPso) dans le cadre d'un article en cours de finalisation (**Résultats -II**). Puis je m'intéresse, avec la présentation d'un travail en cours (**Résultats -III**), à l'expression de MDR1 par ces Teff CD73<sup>+</sup> (mis en évidence dans **Résultats-I**). J'ai notamment évalué le rôle de MDR1 sur cette population dans sa résistance aux drogues de chimiothérapie et la contribution potentielle de cette population à la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette partie résultats est clôturée par la présentation de données complémentaires, qui fournissent aussi de précieuses informations quant à la régulation de l'expression de CD73 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez l'Homme (**Résultats -IV**).





# RESULTATS

---

## I. CARACTERISATION DE LA POPULATION DE TEFF EXPRIMANT CD73 CHEZ L'HOMME EN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE ET CHEZ DES PATIENTES ATTEINTES DE CANCER DU SEIN OU DE L'OVAIRE

Gourdin N., Bossennec M., Rodriguez C., Vigano S., Machon C., Jandus C., Bauché D., Faget J., Durand I., Chopin N., Tredan O., Marie J., Dubois B., Guitton J., Romero P., Caux C.†, Ménérier-Caux C.† († : Co-last authorship).

“Autocrine Adenosine regulates tumor polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> effector T cells devoid of immune checkpoints.” **Cancer Res. 2018. In press (DOI : 10.1158/0008-5472)**

L'action autocrine d'Adénosine régule les Teff CD4<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> polyfonctionnels des tumeurs n'exprimant pas de points de contrôle immunitaires.

### Résumé

La dégradation d'ATP en AMP puis Ado par les Treg exprimant les ecto-nucléotidases CD39 et CD73, a été rapportée comme un mécanisme de résistance aux immunothérapies par anticorps anti-PD-1 et anti CTLA-4 qui sont des points de contrôle immunitaires inhibiteurs (ICPi) () chez la souris dans plusieurs modèles tumoraux. Nous montrons ici que les Treg humains, à l'inverse des Treg murins, n'expriment que CD39 et sont donc capables de produire de l'AMP à partir d'ATP extracellulaire mais ne présentent pas d'activité AMPase. Cette fonction est cependant assurée par une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs polyfonctionnels enrichie en Th1.17 caractérisés par leur expression membranaire de CD73, CCR6, CXCR3, MDR1 et co-produisant les cytokines IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-22 et GM-CSF. Les Treg CD39<sup>+</sup> ciblent préférentiellement ces Teff CD73<sup>+</sup> en coopérant avec eux pour la production d'Ado qui inhibe de manière autocrine la majorité de leurs fonctionnalités excepté leur production d'IL-17A. Les Teff CD73<sup>+</sup> infiltrant les tumeurs primaires du sein et de l'ovaire sont inhibés par les Treg exprimant de forts niveaux de CD39 et présentant une activité ATPase accrue. Par ailleurs, les Teff CD73<sup>+</sup> n'expriment pas ou peu d'ICP inhibiteurs, suggérant que CD73 pourrait représenter un mécanisme de résistance aux traitements avec les antagonistes d'ICPi et pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique non redondante pour restaurer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

# Autocrine Adenosine Regulates Tumor Polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Effector T Cells Devoid of Immune Checkpoints

Nicolas Gourdin<sup>1,2,3</sup>, Marion Bossennec<sup>1,2</sup>, Céline Rodriguez<sup>1,2,3</sup>, Selena Viganò<sup>4</sup>, Christelle Machon<sup>5,6</sup>, Camilla Jandus<sup>4</sup>, David Bauché<sup>2,7,8</sup>, Julien Faget<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Durand<sup>2,9</sup>, Nicolas Chopin<sup>10</sup>, Olivier Tredan<sup>10</sup>, Julien C. Marie<sup>2,7,8</sup>, Bertrand Dubois<sup>1,2</sup>, Jérôme Guittou<sup>5,11</sup>, Pedro Romero<sup>4</sup>, Christophe Caux<sup>1,2,3</sup>, and Christine Ménétrier-Caux<sup>1,2,3</sup>



## Abstract

The production of CD73-derived adenosine (Ado) by Tregs has been proposed as a resistance mechanism to anti-PD-1 therapy in murine tumor models. We reported that human Tregs express the ectonucleotidase CD39, which generates AMP from ATP, but do not express the AMPase CD73. In contrast, CD73 defined a subset of effector CD4<sup>+</sup> T cells (Teffs) enriched in polyfunctional Th1.17 cells characterized by expression of CXCR3, CCR6, and MDR1, and production of IL17A/IFN $\gamma$ /IL22/GM-CSF. CD39<sup>+</sup> Tregs selectively targeted CD73<sup>+</sup> Teffs through cooperative degradation of ATP into Ado inhibiting and restricting the ability of CD73<sup>+</sup> Teffs to secrete IL17A.

CD73<sup>+</sup> Teffs infiltrating breast and ovarian tumors were functionally blunted by Tregs expressing upregulated levels of CD39 and ATPase activity. Moreover, tumor-infiltrating CD73<sup>+</sup> Teffs failed to express inhibitory immune checkpoints, suggesting that CD73 might be selected under pressure from immune checkpoint blockade therapy and thus may represent a nonredundant target for restoring antitumor immunity.

**Significance:** Polyfunctional CD73<sup>+</sup> T-cell effectors lacking other immune checkpoints are selectively targeted by CD39 overexpressing Tregs that dominate the breast tumor environment. *Cancer Res*; 78(13); 3604–18. ©2018 AACR.

## Introduction

During infection or tumor development, ATP is released into the extracellular space and can be found at high levels in inflamed tissues, including tumors (1). Extracellular ATP represents a

proinflammatory alarmin for the immune system. It induces the chemoattraction of dendritic cells (DC) and the activation of inflammasomes and IL1 $\beta$  secretion by monocytes/macrophages (M $\phi$ ) through the engagement of P2 purinergic receptors (for review; ref. 2). Interestingly, the degradation of ATP into adenosine (Ado) by murine CD4<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs), coexpressing CD39 and CD73, has been associated with immunosuppression (3), particularly within tumor environment (4, 5). Mechanistically, CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, *ENTPD1*) degrades ATP and ADP into AMP, which is then hydrolyzed by CD73 (5'-ectonucleotidase, *NT5E*) into Ado. Ado can favor tumor progression by inhibiting the function of immune cells (T cells, monocytes, DCs, and M $\phi$ ), through the engagement of its receptors (AdoR) A2a or A2b (for review; ref. 6). These AdoR induce an increased concentration of intracellular cyclic AMP, resulting in the inhibition of proliferation, cytotoxic functions, and cytokine secretion (IL2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IL13) of T cells (for review; ref. 6). Ado can act also on innate immune cells by inhibiting IL12 production by DCs (7, 8), and inducing IL10 and VEGF secretion by M $\phi$ , which favor immunosuppression and angiogenesis (9, 10). Moreover, Ado can act on nonimmune cells, such as tumor cells, through A1 or A3 receptors coupled to G $\alpha$ i proteins, fostering tumor cell proliferation and migration (for review; ref. 6). The importance of Ado signaling in immunosuppression is evidenced in patients with severe combined immunodeficiency (SCID), in whom accumulation of Ado, due to a lack of adenosine deaminase (ADA) enzyme that degrades Ado into inosine, is observed (11). Remarkably, in CD73-deficient mice, in mice with CD73-deficient Tregs, or in A2a-deficient mice, the antitumor immune response is increased, leading to the tumor

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France. <sup>2</sup>Team 11, Immunology Virology Inflammation (IVI) Department, INSERM U-1052, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France. <sup>3</sup>Innovation and Translational Research Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France. <sup>4</sup>Ludwig Cancer Research Center, Department of Oncology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. <sup>5</sup>Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Laboratoire de Biochimie et Toxicologie, Pierre-Bénite, France. <sup>6</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, ISPB Faculté de pharmacie, Laboratoire de Chimie Analytique, Lyon, France. <sup>7</sup>TGF- $\beta$  and Immuno-evasion Department of Immunology Virology and Inflammation, INSERM U1052, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France. <sup>8</sup>TGF- $\beta$  and Immuno-evasion, Tumor immunology Program, DKFZ, Heidelberg, Germany. <sup>9</sup>Cytometry platform, INSERM U-1052, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France. <sup>10</sup>Centre Léon Bérard, Medical Oncology Department, Lyon, France. <sup>11</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, ISPB Faculté de pharmacie, Laboratoire de Toxicologie, Lyon, France.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

C. Caux and C. Ménétrier-Caux are the co-last authors of this article.

**Corresponding Author:** Christine Ménétrier-Caux, Team 11, INSERM U1052, Cancer Research Center of Lyon, Lyon F-69008, France. Phone 334-7878-2750; Fax: 334-7878-2720; E-mail: christine.caux@lyon.unicancer.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2405

©2018 American Association for Cancer Research.

rejection and to the inhibition of metastases (12–15). Also, in murine models, targeting of CD73 alone or in combination with immunotherapy (anti-CTLA-4 or anti-PD-1) enhances tumor rejection and blocks metastases, demonstrating that endogenous Ado limits the efficacy of these immunotherapies (16, 17).

Studies investigating the expression of CD73 and CD39 on human T cells subsets remain scarce. In fact, despite the poor prognostic value of Tregs in breast and ovarian tumors (18, 19), the coexpression of CD39 and CD73 on human Tregs remains controversial (20–23). A recent report by Doherty and colleagues also suggests the interconnection between CD73 expression on memory CD4<sup>+</sup> T cells and a Th17 profile (24).

Th17 cells, implicated in the response to extracellular pathogens, are characterized by the secretion of IL17A, IL17F, and IL22. Recently, the involvement of a subset of Th17 cells, called Th1.17 coproducing IL17A, IFN $\gamma$ , and GM-CSF, in the development of autoimmune diseases, was unveiled (25), highlighting the polyfunctionality of these cells (26, 27). In tumor biology, a protumoral role of Th17 was reported and mainly associated with the secretion of IL17A; however, coproduction of IFN $\gamma$  and GM-CSF was not considered, except in a recent report, demonstrating that Th1.17-cell subset contributes to tumor rejection (28).

In this study, we demonstrate that CD73, not detected on human Tregs, defines a subpopulation of CD4<sup>+</sup> effector T cells (Teffs) associated with cytokine polyfunctionality similar to that described in Th1.17 cells. CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs cooperate with CD39<sup>+</sup> Tregs to degrade ATP into immunosuppressive Ado inhibiting and restricting function of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs to IL17A secretion. This cooperation does not require cell contact and, in a spaced-out microenvironment, induces specific inhibition of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs through autocrine ATP-derived Ado action without affecting distant CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs. Interestingly, we reveal that CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs are present in breast and ovarian tumor environment together with CD39<sup>high</sup> Tregs and express only low levels of inhibitory immune checkpoints (i-ICP) highlighting CD73 as a potential resistance mechanism to current immunotherapies, and as a nonredundant target for restoring antitumor immunity.

## Materials and Methods

### Human samples

HD-blood was purchased anonymously from the French Blood Service (EFS). In addition, blood and primary tumor samples were obtained from patients with non-pretreated breast tumors and chemotherapy-pretreated ovarian tumors. All of these samples were provided by the tissue bank (BRC) of Léon Bérard Cancer Center (CLB), after approval from the Institutional review board and ethics committee (L-06-36 and L-11-26) and patients' written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. Human healthy colon endoscopic biopsies obtained during routine endoscopic check-ups of healthy donors selected on the basis that they were neither under chemotherapy nor taking antibiotics were obtained from the BRC of the CLB after approval from the Institutional review board and ethics committee (French agreement number: AC-2013-1871) and donors' written informed consent.

### Purification of the different cell subsets

PBMCs were purified from blood of HDs or patients with cancer by Ficoll density gradient. Memory CD4<sup>+</sup> T cells

were purified using MagniSort Human CD4<sup>+</sup> Memory T Cell Enrichment Kit (eBioscience). CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>), CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>) and total Tregs (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) or CD39<sup>+</sup> and CD39<sup>+</sup> Treg subsets were sorted from purified memory CD4<sup>+</sup> T cells by multiparametric FC (flow cytometry; FACSAria III, BD Biosciences) using antibodies against CD25 (2A3, BD Biosciences), CD45RA (2H4LDH11LDB9, Beckman-Coulter), as well as CD127 (eBioRDR5), CD39 (eBioA1), and CD73 (AD2; all from eBioscience), alongside a viability marker (DAPI). Infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells from breast and ovarian tumors and healthy colonic tissues were isolated from single-cell suspensions, obtained by enzymatic disaggregation (18), with the Dynabeads Human CD4<sup>+</sup> Kit (Life Technologies). Tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> Teffs (CD127<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) and Tregs (CD127<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) were sorted from single-cell suspensions by multiparametric FC using antibodies against CD127, CD25, CD45RA, and a viability marker (Fixable Viability Dye, Biolegend).

### Flow cytometry analyses

Multiparametric FC analyses were performed on (i) PBMC from HDs or patients with cancer, or on (ii) single cell suspensions derived either from primary breast and ovarian tumors or healthy colonic tissues. The FC panels used to assess T-cell differentiation relied on the use of anti-human antibodies against CD3 (UCHT1), CD4 (RPA-T4), CD8 (SK1), CD95 (DX2), and CD28 (CD28.2; all from BD Biosciences), CD27 (O323, eBioscience), CCR7 (G043H7, Biolegend), CD45RA, CD39, and CD73 (see above), while those used to evaluate T-cell polarization relied on the use of the anti-human antibodies against CD3, CD4, CD45RA, CD127, CD25, CD39, and CD73 (see above), CCR6 (11A9, BD Biosciences), CXCR3 (G025H7) and CRTH2 (BM16) from Biolegend, and a viability marker. The i-ICPs panel included antibodies against CD3, CD4, CD8 (see above), CD45 (HI30), PD-1 (EH12.1), TIM-3 (7D3; all from BD Biosciences), CD45RA (HI100) and CTLA-4 (L3D10; Biolegend), TIGIT (MBSA43), CD39 and CD73 (eBioscience), and a fixable viability marker (Zombie Fixable Viability Dyes, Biolegend). The production of intracellular cytokines on CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs was analyzed using the test described previously (29) with some modifications, in particular the evaluation of IL22 (22URTI, BD Biosciences) instead of IL21. Cells were analyzed on a LSR-Fortessa (BD Biosciences) and data were processed using the FlowJo Software (Tree Star). For the coexpression of i-ICPs, data were analyzed using the Boolean method on the FlowJo software and then represented using SPICE v5.3 software.

### MDR1 staining and activity assay

Purified memory CD4<sup>+</sup> T cells were incubated with Rh123 (1 $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) for 30 minutes on ice. After washes in PBS, cells were incubated at 37°C for 2 hours (efflux phase). Cells were then washed in PBS and stained with surface markers for FC analysis. In some conditions, a MDR1 inhibitor, Elacridar (1  $\mu$ mol/L, Tocris), or vehicle (DMSO) were added to cells immediately before the efflux phase. MDR1 expression was assessed using an anti-human MDR1 antibody (UIC2, eBioscience) for 20 minutes at 37°C in the presence of Cyclosporin A (25  $\mu$ mol/L; R&D Systems), as described previously (30).

Gourdin et al.

**Transcriptomic analyses**

CD73<sup>-</sup> and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs were sorted from the PBMCs of six HDs blood samples. Cells were activated in the presence of anti-CD3/anti-CD28 beads (expand beads; Life Technologies, ratio 1 bead to 4 cells) in complete RPMI medium [supplemented with antibiotics, l-glutamine (Life Technologies) and 5% of human serum AB<sup>+</sup> (EFS)] at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Resting and short-term activated cells (mix of 6-hour and 24-hour activation), were lysed for mRNA extraction (miRNeasy Micro Kit; Qiagen) and transcriptomic analyses (Human Gene-Expression 8 × 60K Microarray Kit AMADID 039494, Agilent Technologies) were performed.

**Western blot analysis**

Tregs, CD73<sup>-</sup>, or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (2 × 10<sup>6</sup> cells) were isolated and lysed in RIPA buffer in the presence of proteinase inhibitors. Protein lysates were boiled, loaded on Mini-PROTEAN TGX Precast Gels 5%–20% (Bio-Rad) and transferred to Trans-Blot Turbo Mini PVDF membrane (Bio-Rad). CD73 was detected using a mouse anti-hCD73 antibody (1D7, 1/500, Abcam). Pellets of MDA-MB-231 cell line (LGC Standards) whose genetic profile has been verified (Eurofins Forensic Department) and negative for *Mycoplasma* (MycAlert Mycoplasma Detection Kit; Lonza) and human purified HD blood monocytes were used as positive and negative control, respectively. ADA and A2b receptors were assessed either on purified CD73<sup>-</sup> or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, or after 1 or 4 days activation with expand beads (ratio 1:4), using a goat anti-A2bR antibody (ab40002, 1/1,000; Abcam) and a mouse anti-hADA antibody (ab54969, 1/500; Abcam). The HRP-coupled secondary antibodies used were goat anti-mouse Ab (12-349, 1/5,000; Upstate) and rabbit anti-goat Ab (P0449 1/2000; Dako). Membranes were revealed with Luminata Crescendo Reagent (Millipore) and analyzed on Chemidoc system (Bio-Rad).

**Proliferation experiments**

CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs were stained, respectively, with the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; 2 μmol/L; Life Technologies) and CellTrace Violet (CTV; 20 μmol/L; Life Technologies) proliferation markers, while Tregs were costained with both CFSE and CTV according to manufacturer's instructions. CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (3 × 10<sup>4</sup>) alone, in coculture with Tregs (total or sorted CD39<sup>+</sup> and CD39<sup>-</sup> subsets) at a ratio 1:1 or coculture of CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs and Tregs at physiologic ratio (70%:20%:10%) were incubated with expand beads (ratio 1:4) in 96-round-bottom well plates (Falcon) in 200 μL of complete RPMI medium for 4 days at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Ado, AMP, or ATP (Sigma-Aldrich) were added every day at the indicated concentration, whereas the CD73 inhibitor (APCP, 50 μmol/L; Sigma-Aldrich), CD39 inhibitor (ARL-67156, 250 μmol/L; Tocris) or rhADA (1 μg/mL; R&D Systems) were preincubated for 30 minutes before the beginning of the culture. At the end of the experimental time course, cells were harvested and stained with a viability marker (LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stains) and fixed in 2% formaldehyde. Cell proliferation was analyzed under an inverted Zeiss microscope (objective 4×) using an Axiovision 4 software (Zeiss), and by FC (LSR Fortessa, BD Biosciences) according to the CFSE and CTV dilution.

For experiments in Transwell Permeable Supports (polycarbonate membrane 0.4-μm pore, Corning), in the 6.5-mm inserts,

6 × 10<sup>4</sup> CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs alone or in coculture with Tregs (at a ratio of 1:1) were activated using expand beads (ratio of 1:4) in the presence, in the bottom wells, of 1.5 × 10<sup>5</sup> CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs alone, or in coculture with Tregs (at a ratio of 1:4) and expand beads (ratio 1:4), in a total volume of 800 μL.

**Cytokine analysis**

CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (5 × 10<sup>4</sup>) were activated with either PMA (50 ng/mL)/ionomycin (1 μg/mL) (Sigma-Aldrich) for 24 hours or expand beads (ratio of 1:4) for 48 hours in complete RPMI at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, and in the presence or absence of Ado (75 or 100 μmol/L). Supernatants were harvested and frozen, and cytokines were analyzed by ELISA using Luminex Multiplex Kits (eBioscience; Multiplex 1: IL2/TNFα/IFNγ/IL22/IL17A/IL10/IL13/IL21; Multiplex 2: GM-CSF/IL3).

**Nucleotide and nucleoside quantification by HPLC coupled to LC-MS/MS**

The capacity of 5 × 10<sup>4</sup> Tregs, CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs alone or coculture of Tregs with either CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (ratio 1:1), to degrade ATP or AMP was analyzed after 2-hour incubation at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> with labeled ATP<sub>13C,15N</sub> or AMP<sub>13C,15N</sub> (all from Sigma-Aldrich) in 200 μL of serum-free RPMI medium supplemented with antibiotics and l-glutamine (Life Technologies). In some cases, cells were preincubated with ARL-67156 (250 μmol/L) or APCP (50 μmol/L) for 30 minutes before the experiment. Cell supernatants were harvested, boiled at 65°C for 5 seconds, and frozen at -20°C. ATP<sub>13C,15N</sub>, AMP<sub>13C,15N</sub>, Ado<sub>13C,15N</sub>, and Inosine<sub>13C,15N</sub> were quantified in 50 μL of supernatant. Nucleotides and nucleosides were extracted using off-line Oasis-WAX cartridges (60 mg; 3 cc). Briefly, cartridges were conditioned using 2 mL of methanol and 2 mL of water. After sample loading, cartridges were washed with 1 mL of water. Elution was performed thrice using 1 mL of the following mixture: NH<sub>4</sub>OH 0.25% pH 10.0/water/acetonitrile (30/30/40, v/v). Eluates were pooled and gas dried under nitrogen at 37°C. The residue was suspended in 250 μL of 5 mmol/L HA-0.5% DEA in water, and 10 μL was injected into a liquid chromatograph.

Analysis was performed using LC/MS-MS as described previously by Machon and colleagues (31). Quantification was conducted by adding standard solutions of labelled nucleotides (ATP<sub>13C</sub>, AMP<sub>15N</sub>, Ado<sub>13C</sub>, and inosine<sub>15N</sub>) to samples prior to the extraction step. ATP<sub>15N</sub> and GMP<sub>13C,15N</sub> were used as internal standards. Concentrations of nucleotides in the supernatants were calculated using calibration curves of the corresponding labeled nucleotides. We also verified that ARL-67156 (250 μmol/L) and APCP (50 μmol/L) did not interfere with the ATP, AMP, Ado, and inosine quantifications.

**Multi-immunofluorescence stainings on frozen tumor sections**

Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek) embedded frozen human primary breast tumors were used to generate 6-μm frozen tissue sections with Cryotome (Thermo Fisher Scientific). Sections were fixed in paraformaldehyde, permeabilized in Triton X-100, and stained with murine anti-human CD4-AF488 (Biolegend, Clone RPA-T4), rat anti-human FoxP3-APC (eBioscience, Clone PCH101), and uncoupled rabbit anti-human CD73 (Cell Signaling Technology, Clone D7F9A). CD73 staining was revealed with secondary donkey anti-rabbit antibody (Life Technologies). Immunofluorescence stainings

were analyzed on Upright Microscope (Nikon Ni-E) using ImageJ free software.

## Results

### CD39 and CD73 are expressed by distinct memory CD4<sup>+</sup> T cells in humans

We initially observed by FC that human CD4<sup>+</sup> T cells in the blood of healthy donors (HD-blood) did not coexpress CD39 and CD73, but exclusive CD39<sup>+</sup> or CD73<sup>+</sup> cells were observed among CD4<sup>+</sup> T-cell populations (Fig. 1A). While naïve CD4<sup>+</sup> T cells expressed no or very low levels of CD39 and CD73 (Fig. 1A and B), the expression of CD39 and CD73 was detectable on memory CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 1A). Among memory CD4<sup>+</sup> T cells, CD39, but not CD73, was expressed at variable levels on human HD-blood Tregs defined by FoxP3 expression (Fig. 1A and C). The absence of CD73 expression on Tregs purified from blood was also confirmed by Western blot analysis (Fig. 1D). In contrast, CD73, but also CD39, can be expressed on distinct populations of CD4<sup>+</sup> T cells defined by the absence of FoxP3 expression (Fig. 1A and E). Of note, the intensity of CD73 expression on CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher compared with naïve CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 1F). Moreover, the percentage and the intensity of CD39 expression were lower on CD4<sup>+</sup> T cells compared with Tregs [ $\Delta$  CD39 mean fluorescence intensity (MFI) Tregs/CD4<sup>+</sup> T cells:  $1.64 \pm 0.33$ ].

Our results demonstrate that in contrast to murine Tregs, human Tregs only express CD39. They also highlight the expression of CD73 on a subset of CD4<sup>+</sup> T cells. Thus, we wondered whether the expression of CD73, favoring the generation of Ado, on a subset of CD4<sup>+</sup> T cells may denote a functional specialization of this population.

### CD73 identifies a population of CD4<sup>+</sup> T cells enriched in polyfunctional Th1.17 cells

We analyzed by FC the expression pattern of the chemokine receptors CRTH2, CXCR3, and CCR6 on blood CD73<sup>+</sup> versus CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells to determine the relative percentage of Th1 (CRTH2<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>), Th2 (CRTH2<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>), Th17 (CRTH2<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>), and Th1.17 (CRTH2<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>; Supplementary Fig. S1A; ref. 26). CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells contained a similar proportion of Th1, Th17, and Th2 subsets as CD73<sup>-</sup> T cells, but exhibited an increased proportion of the Th1.17 subset, which accounted for  $27.98\% \pm 7.99\%$  of total cells, at the expense of other Th cells (Fig. 2A; Supplementary Fig. S1B). Consistent with this Th1.17 enrichment, a higher proportion of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells migrated toward a CXCL10 or CCL20 gradient in Transwell chemotaxis assays (Supplementary Fig. S1C). Analysis of the transcriptome of purified CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells after short-term TCR stimulation revealed an overexpression of Th1.17-related genes (*CSF2*, *ABCB1*, *IL22*, *IL3*, *IFNG*, *GZMB*, *IL23R*, *TBX21*, *LGALS3*; refs. 25, 27) in the former subset, while genes related to Th2 cells (*IL4*, *IL10*, *IL13*, *CCR4*) and Th17, Tfh, or Tr1 (*LRMP*, *IKZF3*, *CXCR5*, *IL21*, *IL10*) were downregulated (Fig. 2B). *IL17A* and *IL17F* genes were not detected likely due to insufficient sensitivity of transcriptomic chip used in our conditions.

We also performed short-term *in vitro* reactivation of PBMCs with PMA/ionomycin to analyze cytokines production by intracytoplasmic staining in CD73<sup>+</sup> versus CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. We found a higher proportion of cells producing IL2, TNF $\alpha$ , IL17A,

IFN $\gamma$ , and IL22, in CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2C). More precisely, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were enriched in cells coproducing IFN $\gamma$ /IL17A (Fig. 2C). A multiplex immunoassay performed with supernatants of these *in vitro* activated subsets confirmed the significantly increased production of all cytokines but also of IL3 and GM-CSF by CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2D) except IL2 analyzed by FC (Fig. 2C). In addition, this assay revealed the low production of IL10, IL13, and IL21 (Fig. 2D) compared with CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in accordance with Th1.17 gene signature (Fig. 2B).

One of the most upregulated genes differentiating CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2B) after CSF2 gene (coding for GM-CSF) is the *ABCB1* gene, coding for the multidrug transporter MDR1 and recently proposed as a Th1.17-specific marker (27). A significantly increased expression of MDR1 on CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells compared with CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> ones was observed at the protein level by FC (Fig. 2E) and at the functional level with the Rh123 exclusion assay (Fig. 2E; Supplementary Fig. S1D).

Taken together, our results demonstrate that CD73 identifies a subset of CD4<sup>+</sup> T cells enriched in polyfunctional Th1.17 cells. Consistent with this conclusion, a high proportion of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells was observed in the colon of healthy individuals (Fig. 2F), a mucosal tissue known to be enriched in Th17 and Th1.17 populations (32).

### CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells cooperate with CD39<sup>+</sup> Tregs for Ado production

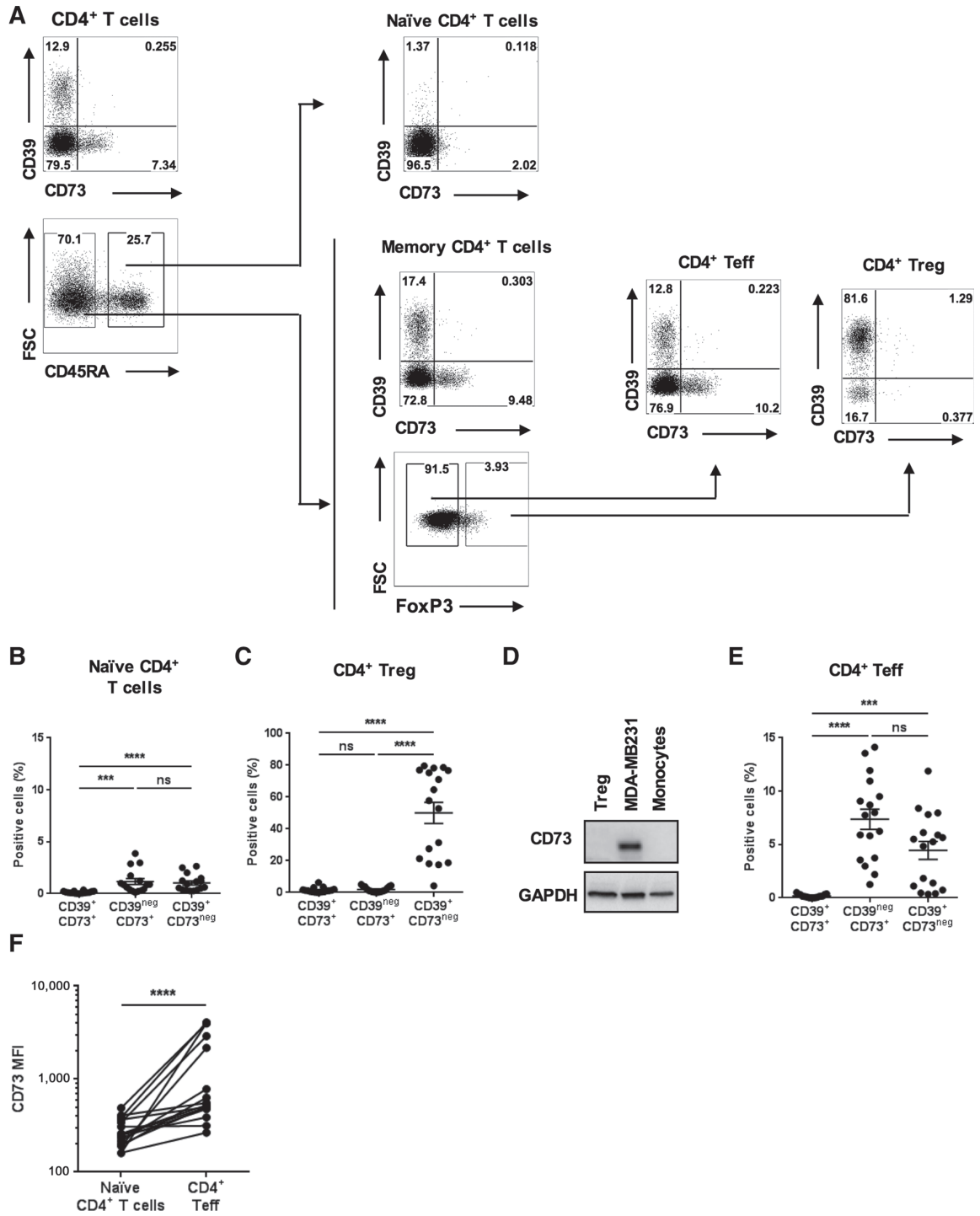
Next, we evaluated the capacity of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to generate Ado from AMP through the measurement of nucleotides and nucleosides by HPLC (31). AMP degradation and generation of Ado were observed after 2-hour incubation with AMP and were abrogated by a specific CD73 inhibitor (Fig. 3A). Whereas purified human CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were not able to degrade ATP (Fig. 3B), purified human Tregs were able to degrade  $48.24\% \pm 6.20\%$  of ATP into AMP without generation of Ado (Fig. 3B). We confirmed that degradation of ATP results from CD39 expression by Tregs as only purified CD39<sup>+</sup> Tregs but not CD39<sup>-</sup> Tregs generated AMP and that ATP degradation was blocked by a CD39 inhibitor (Fig. 3C). The addition of purified CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells with Tregs favored the generation of Ado following ATP degradation (Fig. 3B).

### Ado suppresses proliferation and restricts polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to IL17A secretion

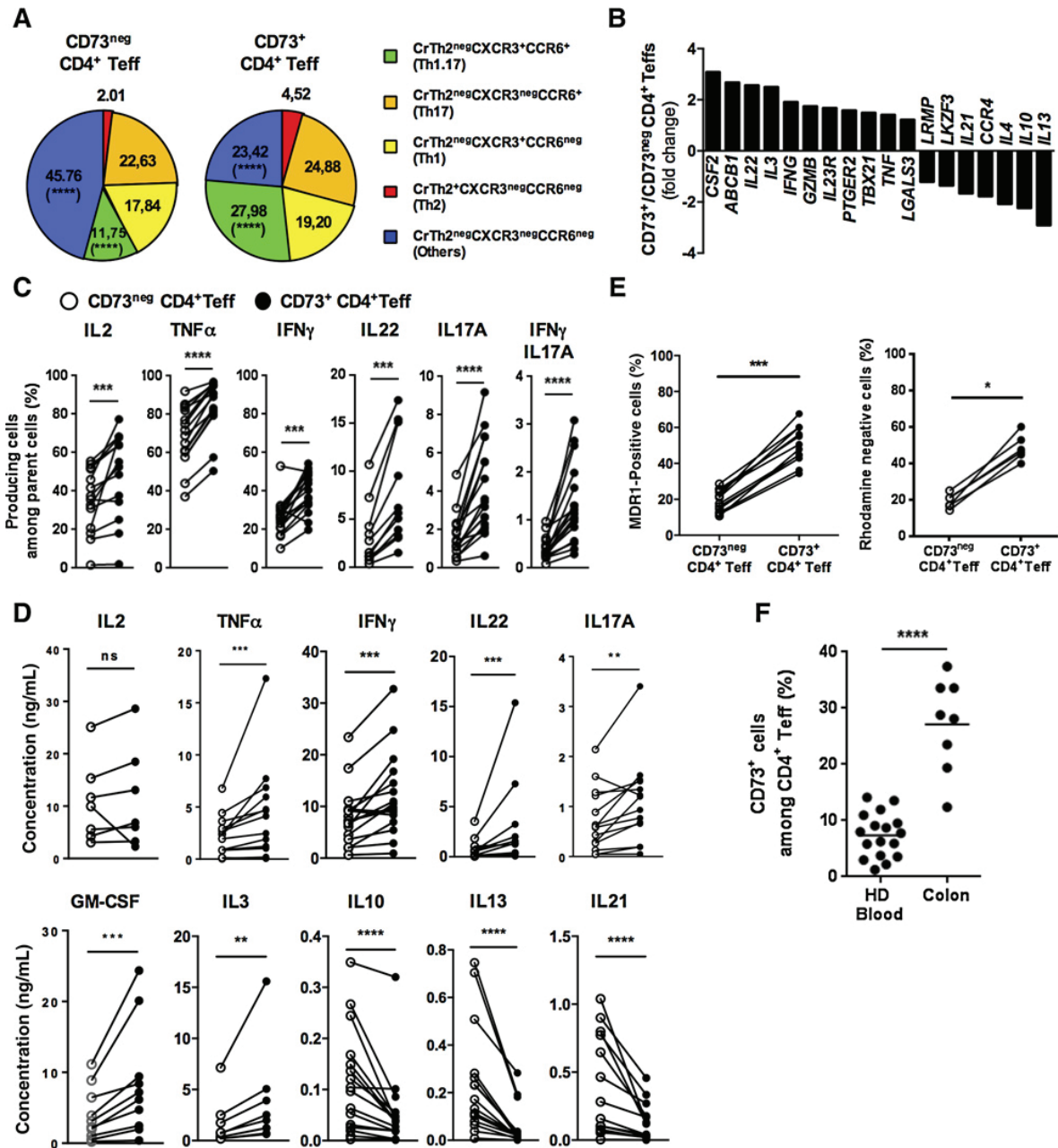
The capacity of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to generate Ado suggests that these cells may be particularly sensitive to Ado. This immunosuppressive molecule exerts its immunosuppressive functions by engaging A2a or A2b receptors but can be degraded into inosine by the enzyme ADA. Our transcriptomic data revealed that *ADORA2A*, but not *ADORA2B*, was expressed on resting CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, and that both receptors were upregulated following short-term TCR triggering (Fig. 4A). In contrast, *ADORA1* (*A1R*) and *ADORA3* (*A3R*) were not detected as described in the literature (6). *ADA* mRNA expressed at steady state decreased after activation on both subsets (Fig. 4A). The modulation observed for *ADORA2B* and *ADA* at mRNA level was confirmed at the protein level, which gradually increased for A2bR and decreased for ADA until 4 days of activation (Fig. 4B). These data demonstrated the acquisition of an Ado-sensitive phenotype by CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells upon TCR triggering, as



Gourdin et al.



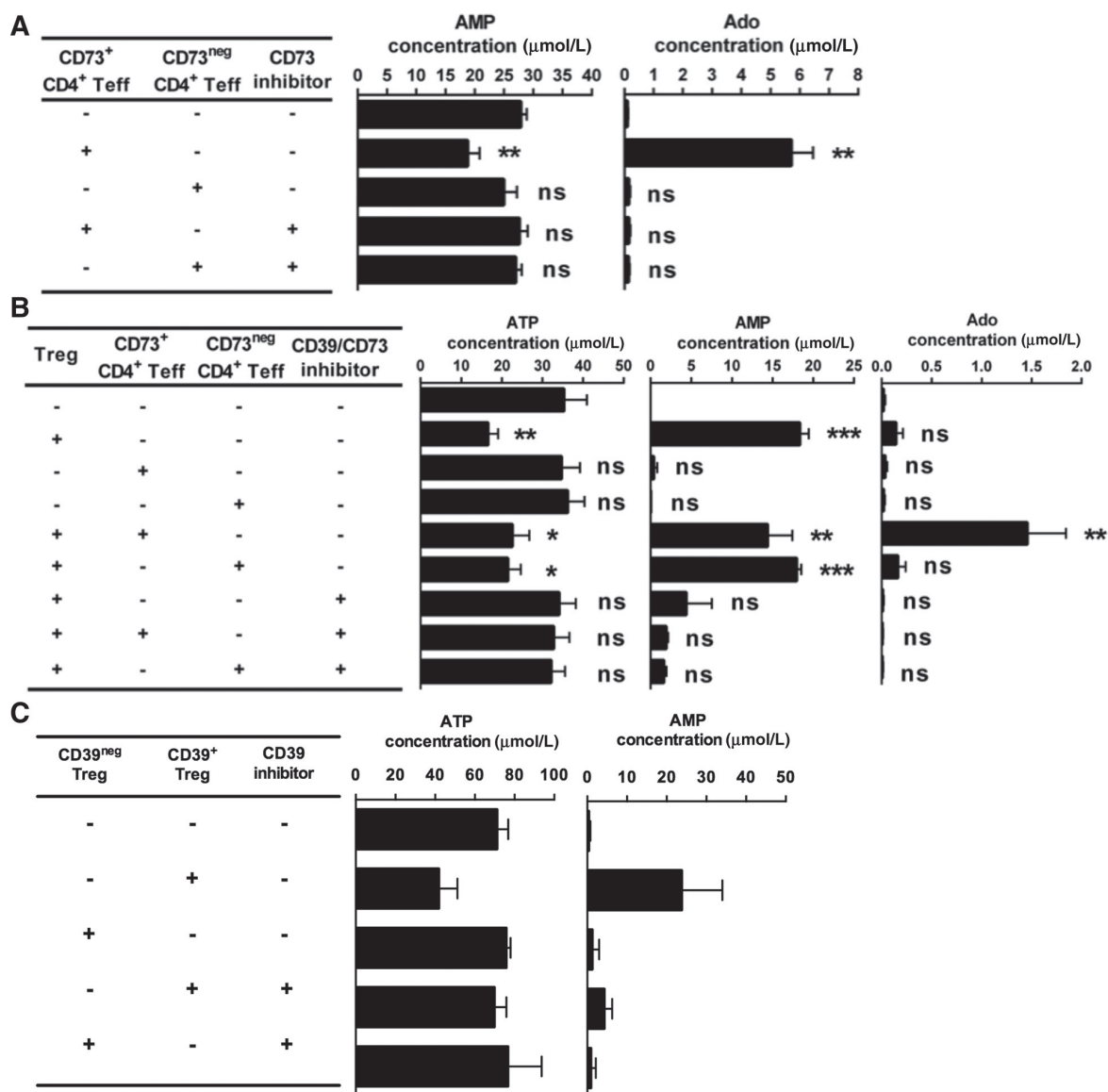
**Figure 1.** CD39 and CD73 are expressed on distinct subsets of memory CD4<sup>+</sup> T cells. **A**, Representative expression of CD39 and CD73 on CD4<sup>+</sup> T-cell subsets from HD-blood analyzed by FC. **B**, **C**, and **E**, Cumulative data from 17 donors of the different subsets defined by the expression of CD39 and CD73 among naïve CD4<sup>+</sup> T cells (**B**), CD4<sup>+</sup> Tregs (**C**), and CD4<sup>+</sup> Teffs (**E**; statistical analysis, Friedman test). **D**, Tregs were analyzed for CD73 expression by Western blot analysis (CD73, 70 kDa). **F**, Intensity of CD73 staining on naïve CD4<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> Teffs (statistical analysis, Wilcoxon test). \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, nonsignificant.



**Figure 2.**

CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are enriched in polyfunctional Th1.17 cells. **A**, HD-blood CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed by FC for their composition in Th subsets. Data represent mean of 7 donors. **B**, Transcriptomic analysis was performed on resting or short-term activated CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T cells ( $n = 6$ ;  $P < 0.05$  for the genes presented) and genes related to Th profiles were extracted. **C**, Percentage of IL2 or TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL22, and IL17A-producing cells and IFN $\gamma$ /IL17A coproducing cells was assessed by FC on CD73<sup>+</sup> (black) and CD73<sup>neg</sup> (white) CD4<sup>+</sup> T cells from HD-blood after short-term PMA/ionomycin reactivation (statistical analysis, Wilcoxon test). **D**, Quantification of cytokines produced by purified HD-blood CD73<sup>+</sup> (black) and CD73<sup>neg</sup> (white) CD4<sup>+</sup> T cells activated for 24 hours with PMA/ionomycin ( $n = 16$  for IL2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL17A, IL10, IL13, and IL21, with exception due to out-of-range quantification, and  $n = 10$  for IL22, GM-CSF, and IL3; statistical analysis, Wilcoxon test). **E**, MDR1 expression and MDR1 functionality were assessed by FC on CD73<sup>+</sup> (black) and CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> (white) T cells (statistical analysis, Wilcoxon test). **F**, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells frequency in HD-blood and healthy colonic tissues (statistical analysis, Mann-Whitney test). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, nonsignificant.

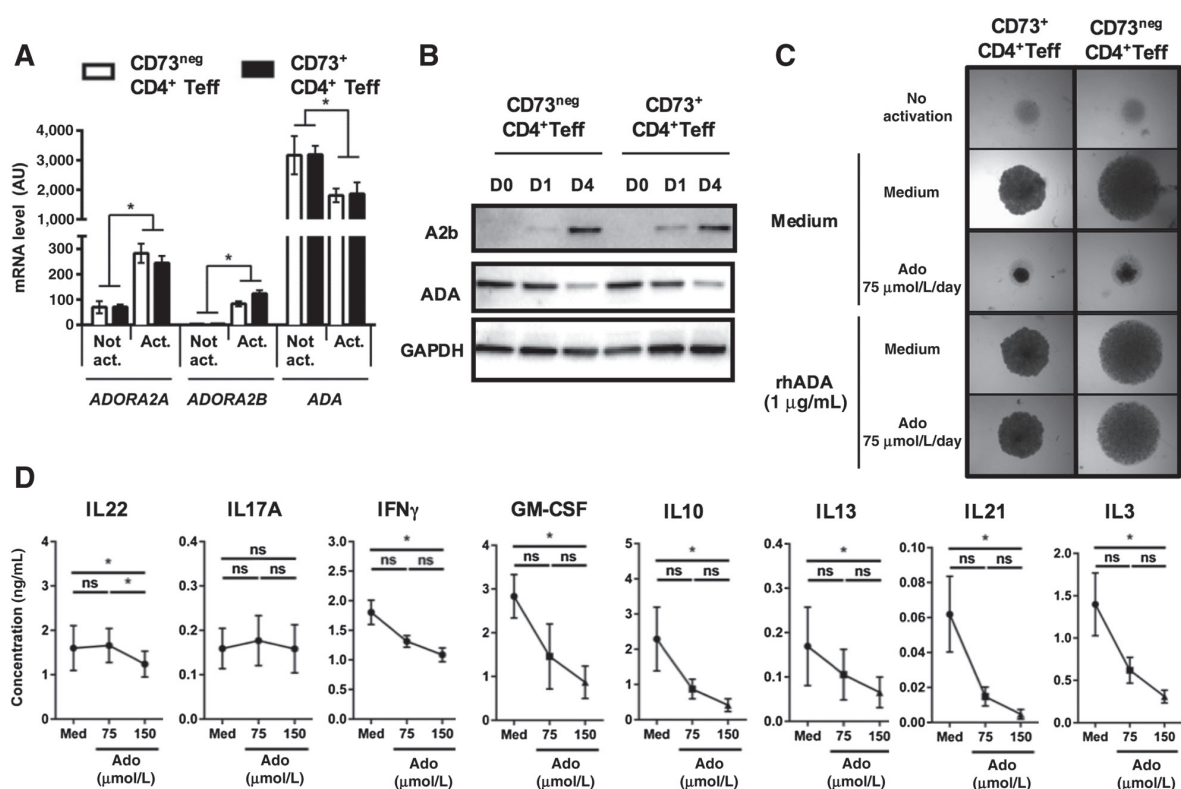
Gourdin et al.



**Figure 3.** CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs cooperate with Tregs to degrade ATP into Ado. **A**, The capacity of HD CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs to degrade AMP into Ado was analyzed after a 2-hour incubation with the stable AMP<sub>13C,15N</sub> isotope (37.5 μmol/L). Residual and generated metabolites were quantified by mass spectrometry-coupled HPLC and the role of CD73 was confirmed by preincubation of cells with the CD73 inhibitor (APCP, 50 μmol/L) for 30 minutes before AMP addition. Experiments were performed in duplicate (n = 3 donors; statistical analysis, Friedman test). **B**, The capacity of HD-blood Tregs alone or cocultured with CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs (ratio 1:1) to degrade ATP into Ado was analyzed after 2-hour incubation with ATP<sub>13C,15N</sub> isotope (37.5 μmol/L); residual and generated metabolites were quantified by mass spectrometry-coupled HPLC. The role of CD39 and CD73 was confirmed by preincubation of cells with the CD39 inhibitor (ARL-67156, 250 μmol/L) and/or the CD73 inhibitor (APCP, 50 μmol/L) for 30 minutes before ATP addition. Experiments were performed in duplicate (n = 3 donors; statistical analysis, Friedman test). **C**, Cell-sorted CD39<sup>neg</sup> and CD39<sup>+</sup> Treg capacity to degrade ATP<sub>13C,15N</sub> isotope (37.5 μmol/L) was analyzed by quantification by mass spectrometry coupled-HPLC of ATP and metabolite (AMP) generated. The role of CD39 was confirmed by preincubation of cells with the CD39 inhibitor (ARL-67156, 250 μmol/L). Experiments were performed on three donors. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; ns, nonsignificant.

observed in the murine model (3). Otherwise, no significant difference in the cell proliferation capacities of both subsets was observed using same proliferation markers evaluated by FC (Supplementary Fig. S1E).

The metronomic addition of exogenous Ado (75 μmol/L/day) inhibited the proliferation of both subsets as shown by the reduction of cell clusters size (round-bottom well observation; Fig. 4C) and dilution of the CTV proliferation marker

**Figure 4.**

Ado suppresses proliferation and restricts polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to IL17A secretion. **A**, Gene expression profiles of ADA and Ado receptors (AdoRa2a and AdoRa2b) were extracted from transcriptomic analyses of purified resting CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (statistical analysis, two-way ANOVA). **B**, AdoRa2b and ADA protein levels in CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells before and after 1- or 4-day activation with expand beads were quantified by Western blot analysis. **C**, The impact of Ado (75 μmol/L/day) on the proliferation of purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T cells after activation using expand beads (1:4) was assessed by microscopy after 4 days. In some conditions, cells were preincubated for 30 minutes with rhADA (1 μg/mL) before adding Ado. Data are representative of three donors. **D**, The impact of metronomic doses of Ado (37.5 μmol/L or 75 μmol/L/day) on cytokine secretion (IL22, IL17A, IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL10, IL13, IL21, and IL3) by purified CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells was quantified by Multiplex Luminex assay in the supernatant of cells after a 48-hour-culture period with expand beads (1:4; statistical analysis, Friedman test). \*,  $P < 0.05$ ; ns, nonsignificant.

(Supplementary Fig. S2) compared with the medium condition. The addition of recombinant ADA (rhADA, 1 μg/mL), restored the proliferative capacity of both T-cell subsets (Fig. 4C; Supplementary Fig. S2).

The impact of Ado was also analyzed on the cytokines production capacity of both purified CD4<sup>+</sup> T cells subsets. To avoid any confounding effects of Ado on proliferation, cytokine secretions were analyzed after 2 days of TCR triggering, determined as the optimal time lapse for cell activation without proliferation. Of great interest, Ado significantly inhibited the secretion of most of the cytokines produced by CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells except IL17A and only a slight effect was observed on IL22 secretion (Fig. 4D).

These results indicate that Ado suppresses the proliferation of both subsets in the same manner but dramatically restricts the functionality of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to IL17A production.

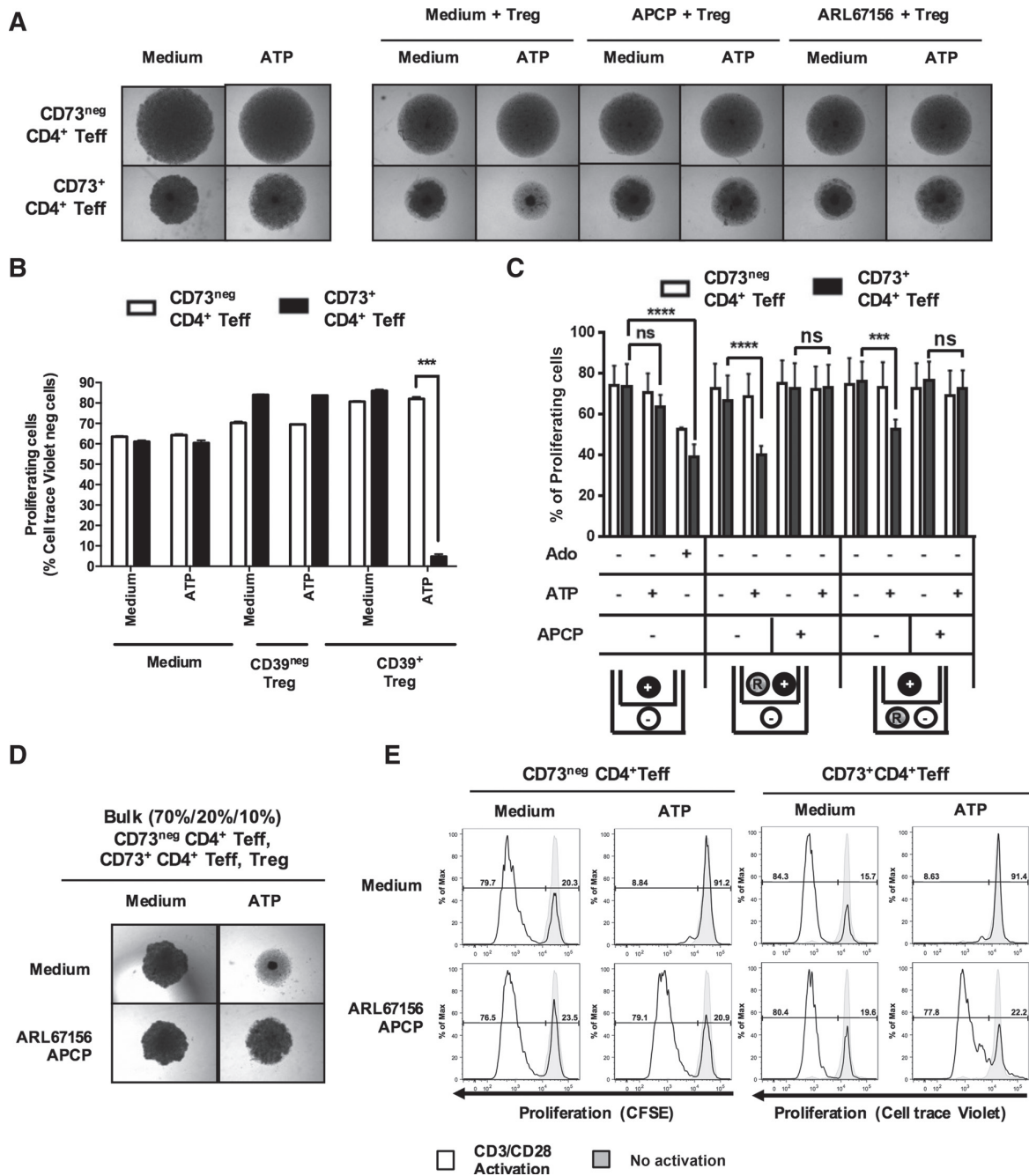
#### CD39<sup>+</sup> Tregs make CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells sensitive to ATP-derived Ado in spaced-out environment

We previously observed that CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were able to generate Ado from AMP produced by the ATP degradation from CD39<sup>+</sup> Tregs (Fig. 3). Moreover, we found that functional CD73

on CD4<sup>+</sup> T cells favored their suppression mediated by AMP-derived Ado similar to that observed in presence of exogenous Ado (Supplementary Fig. S3A and S3B). We then analyzed the biological impact of the cooperation between CD39<sup>+</sup> Tregs and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, by coculturing Tregs with purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in presence or absence of exogenous ATP. As reported previously (18, 33), Tregs did not present any sign of proliferation, due to their anergic status. Conversely, the proliferation of purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells was unaltered by the addition of Tregs, due to the strong TCR triggering signal. Although, ATP alone did not modulate the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells subpopulations, combination of Tregs and ATP strongly suppressed the proliferation of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, but not CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. This inhibition was reversed by the addition of inhibitors of CD73 (APCP) or CD39 (ARL67156) (Fig. 5A; Supplementary Fig. S4).

Similar suppression experiments performed with Treg subsets sorted on the basis of CD39 expression confirmed that CD39<sup>+</sup> Tregs, but not CD39<sup>-</sup> ones, suppressed specifically the proliferation of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in presence of exogenous ATP (Fig. 5B).

Gourdin et al.



**Figure 5.**

Isolated CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs are preferential target of CD39<sup>+</sup> Tregs through the generation of Ado. **A** and **B**, The impact of ATP (18.75 μmol/L/day) on the proliferation of purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs alone or in coculture with total Tregs (**A**), or cell-sorted CD39<sup>+</sup> and CD39<sup>neg</sup> Tregs (**B**) at a ratio of 1:1 was assessed by microscopy (**A**) or by CTV dilution (**B**) 4 days after their activation with expand beads (ratio 1:4). **C**, Similar experiments were performed using Transwell plates. CD73<sup>+</sup> (black) and CD73<sup>neg</sup> (white) CD4<sup>+</sup> Teffs were cultured in the top and bottom chambers, respectively, in the presence of with expand beads (ratio 1:4), with or without ATP (18.75 μmol/L/day) or Ado (75 μmol/L/day), and total Tregs (R) were added either in the top or bottom chamber. **D** and **E**, The impact of ATP was also assessed on the proliferation of CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs after the addition of Tregs, all present at a physiologic ratio (20%/70%/10%), by microscopy and by FC, by measuring the dilution of proliferation markers (CTV: CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs; CFSE: CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs). The impact of CD73 and CD39 was assessed by preincubating cells with inhibitors of CD73 (APCP, 50 μmol/L) and CD39 (ARL-67156, 250 μmol/L) for 30 minutes. \*\*\*\*, *P* < 0.0001; ns, nonsignificant.

Transwell experiments enabled us to address the importance of the colocalization of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs and Tregs in this Ado-mediated suppression. CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs were cultured in the top chamber and CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs in the bottom one, whereas Tregs were added in either one or the other. The addition of exogenous ATP, whatever the localization of Tregs, induced a strong inhibition of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg proliferation, indicating that the colocalization of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs and Tregs is not necessary to obtain ATP-mediated inhibition of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (Fig. 5C).

Of importance, these experiments revealed that the proliferation of CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs localized in the bottom chamber was not altered by Ado generated by CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs in the top one demonstrating that CD73<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> Tregs were preferentially inhibited by Tregs through Ado generation (Fig. 5C). As Ado similarly inhibited purified CD73<sup>-</sup> or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs in "U" wells (Fig. 4C) and in Transwell (Fig. 5C), we addressed the importance of both CD4<sup>+</sup> Tregs populations' colocalization for Ado-mediated inhibition resulting from ATP degradation. In cultures where Tregs, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, and CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, mixed at physiologic ratio observed in blood (10%/20%/70%), were colocalized altogether in "U" wells, the CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs subset was suppressed by autocrine generation of Ado through collaboration with Tregs, but the CD73<sup>-</sup> population was also suppressed by paracrine action of generated Ado (Fig. 5C-E). This demonstrated that, in a culture system favoring close interactions between T-cell subsets, cooperation of Tregs and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs degrading ATP into Ado, inhibited proliferation of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs but also surrounding CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs.

Collectively, these data highlight that the cooperation between Tregs and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs does not require cell contact. Furthermore, Ado, acting in an autocrine manner on CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, does not affect the proliferation of CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs except if they are colocalized at high cell density, through collateral paracrine effect. Altogether, our data suggest that the CD73<sup>+</sup> population among CD4<sup>+</sup> Tregs is selectively targeted by CD39<sup>+</sup> Tregs through autocrine Ado production.

#### CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs are present in the tumor microenvironment enriched in CD39<sup>+</sup> Tregs

We analyzed CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs and CD39<sup>+</sup> Tregs in patients with primary breast or ovarian tumors. The frequency of memory cells among CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary Fig. S5A), Tregs among memory CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary Fig. S5B), and the CD39/CD73 expression pattern on Tregs and CD4<sup>+</sup> Tregs in breast tumor- or ovarian tumor-blood were similar to that observed in healthy donors (Fig. 6A and B). However, in contrast to that observed on CD4<sup>+</sup> Tregs, the percentage and intensity of CD39 on Tregs tended to increase in breast tumor-blood (62.31% ± 14.94%) and ovarian tumor-blood (62.79% ± 14.93%), compared with HD-blood (50.01% ± 24.88%). Conversely, there was no modulation of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs' proportion (Supplementary Fig. S5C), cytokine production pattern (Supplementary Fig. S5D) or Rh123 efflux capacity (Bossennec, manuscript in preparation), in the blood of patients with cancer.

In breast and ovarian tumor tissues, we observed a strong enrichment of memory cells among CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary Fig. S5A) and of Tregs among memory CD4<sup>+</sup> T cells, which frequency reached roughly three times that found in patient's blood as reported previously by our team (18) and others (19). In

the breast tumor and ovarian tumor microenvironment, as observed in blood, Tregs expressed CD39 but not CD73 (Fig. 6A). Interestingly, the percentage of CD39<sup>+</sup> Tregs was also increased, leading to an increase of CD39<sup>+</sup> Tregs frequency among total CD4<sup>+</sup> T cells of about four folds compared with blood. Finally, the intensity of CD39 expression was also significantly higher in breast tumor and ovarian tumor compared with matched blood (Fig. 6C and D). In addition, CD39 expression on tumor-infiltrating Tregs was higher than on CD4<sup>+</sup> Tregs in terms of percentage and intensity of expression (Fig. 6E and F). The upregulated CD39 expression on tumor Tregs compared with blood Tregs was associated to an increased capacity to degrade exogenous ATP into AMP (Fig. 6G). In contrast, the proportion of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs was not significantly modulated in the tumor microenvironment (breast tumor: 4.74% ± 2.64%; ovarian tumor: 4.73% ± 2.71%) compared with blood (HD-blood: 7.37% ± 3.21%; Fig. 6B and H). Tumor-infiltrating CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, activated with PMA/ionomycin, presented a higher percentage of IL2, TNFα, IFNγ, IL17A producers, and IFNγ/IL17A coproducers compared with the CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (Fig. 6I), as observed in breast tumor- and ovarian tumor-blood (Supplementary Fig. S5D) and HD blood (Fig. 2D). Multi-immunofluorescence stainings on primary breast tumor frozen sections confirmed the codetection of Tregs (FoxP3<sup>+</sup>) and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs within the stromal immune infiltrate (Fig. 6J).

The presence of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs and the enrichment of CD39<sup>+</sup> Tregs in breast tumor and ovarian tumor support the idea that in breast and ovarian tumor environments, CD39/CD73-mediated Ado generation can occur and suppress CD4<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> Tregs activation.

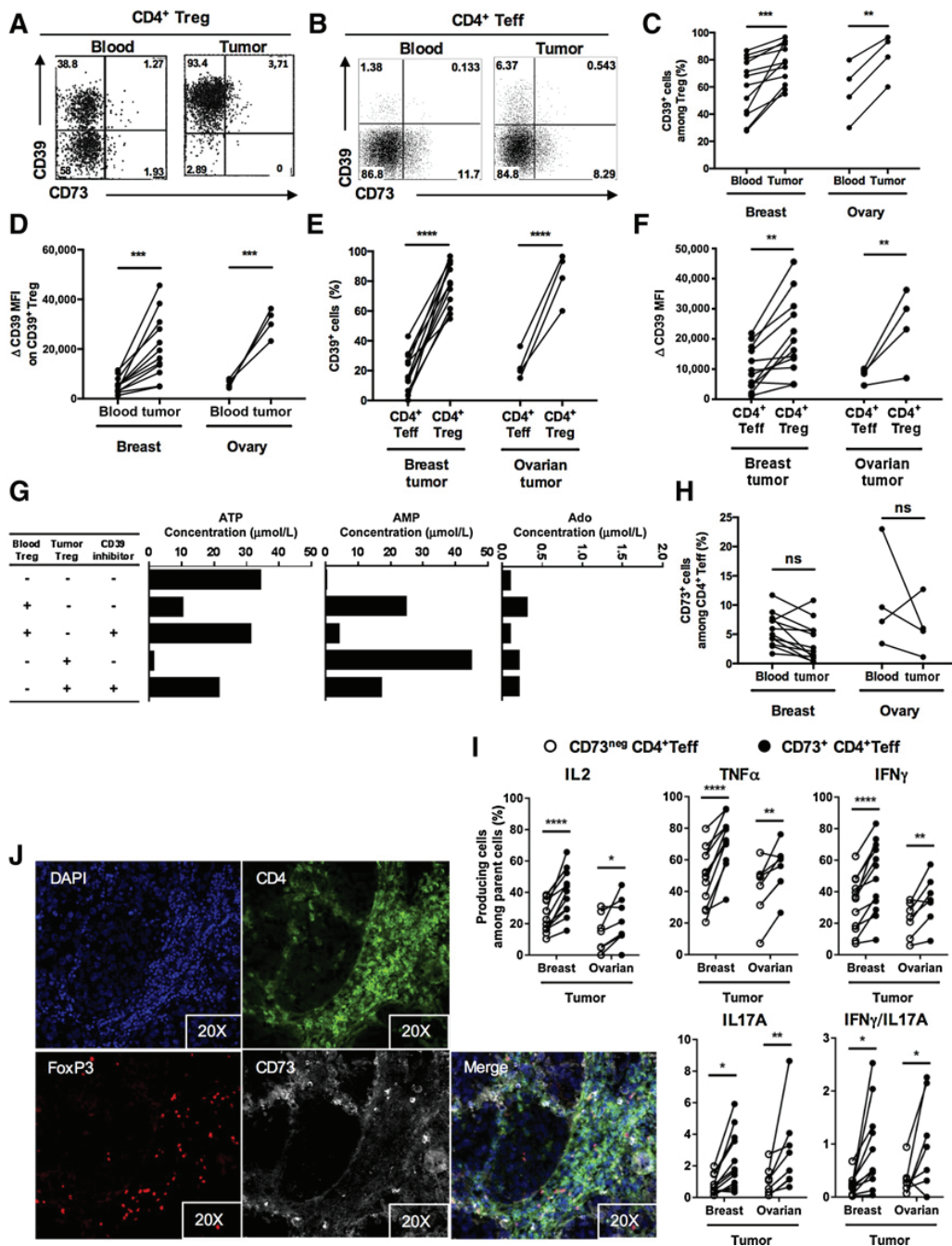
#### Tumor-infiltrating CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs have lower expression of inhibitory immune checkpoints

To determine whether the intrinsic capacity to transform AMP into Ado may constitute the main functional regulatory pathway of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs, we analyzed, by FC, the coexpression of i-ICPs namely TIGIT, CTLA-4, TIM-3, and PD-1 on CD4<sup>+</sup> Tregs (Fig. 7A). i-ICPs expression were mostly observed on tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells compared with paired blood. The relative percentage of TIGIT<sup>+</sup> or PD-1<sup>+</sup> cells was significantly lower in CD73<sup>+</sup> cells compared with CD73<sup>-</sup> ones among CD4<sup>+</sup> Tregs from tumor tissues (Fig. 7A and B). Indeed, tumor-infiltrating CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs contained higher proportion of cells devoid of i-ICPs and fewer cells coexpressing 2, 3, or 4 i-ICPs, compared with CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (Fig. 7C). Moreover, the intensity of PD-1 expression was lower on tumor-infiltrating CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs compared with CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (Fig. 7D).

These findings, associated with the previous evidence that CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs are functionally suppressed by autocrine Ado generated through cooperation with CD39<sup>+</sup> Tregs, strongly suggest that the CD39/CD73/Ado pathway might constitute the main pathway controlling the Th1.17 potency of human CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs.

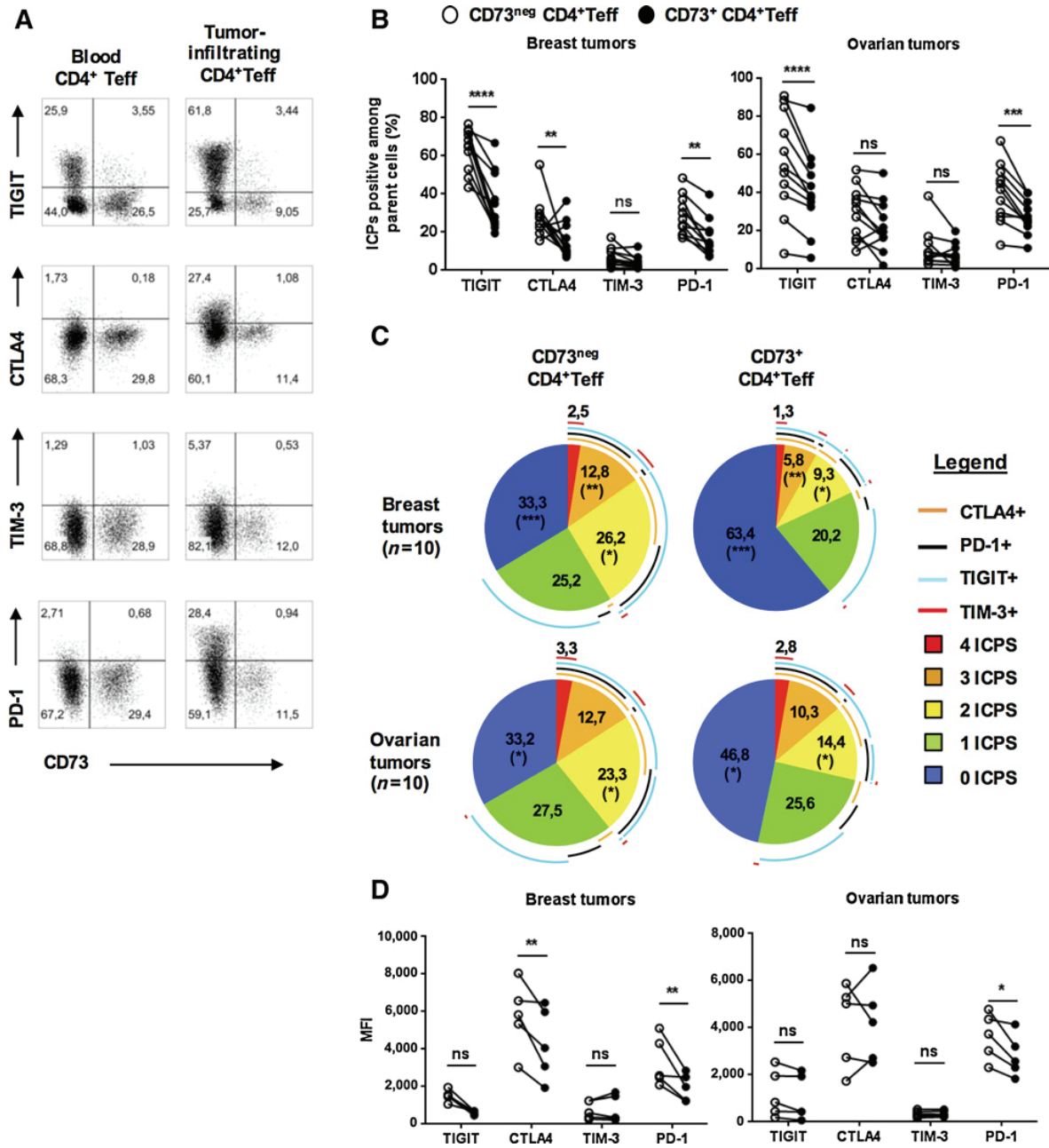
Consistent with this conclusion, analyses done on PD-1 expressing CD4<sup>+</sup> tumor-infiltrating T cells in breast tumors and ovarian tumors unveiled that the proportion of cells devoid of i-ICPs was reduced to 7% among breast tumor-infiltrating PD1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (and 15.5% for ovarian tumors), contrasting with more than 63% among breast tumor-infiltrating CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs (and 46.8% for ovarian tumor; Supplementary Fig. S5E).

Gourdin et al.



**Figure 6.**

Breast and ovarian tumors contain highly functional CD39<sup>+</sup> Tregs and CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Teff with Th1.7 characteristics. **A**, Representative FC expression of CD39 and CD73 on Tregs from paired breast tumor and blood sample. **B**, Representative example of CD39 and CD73 expression on CD4<sup>+</sup> Teffs from paired breast tumor and ovarian tumor and blood samples by FC. The proportion (**C**) and MFI (**D**) of CD39 expression on Tregs from paired blood and breast tumor ( $n = 11$ ) or ovarian tumor ( $n = 4$ ) samples were analyzed by FC (statistical analysis, two-way ANOVA). **E** and **F**, Comparison of CD39% (**E**) and MFI (**F**) of CD4<sup>+</sup> Tregs and Teffs within breast ( $n = 11$ ) and ovarian ( $n = 4$ ) tumor environment. **G**, Purified tumor-infiltrating Tregs were assessed for ATP (37.5 μmol/L) degradation by HPLC and compared with HD-blood Tregs. Thirty minutes preincubation with the CD39 inhibitor (ARL-67156, 250 μmol/L) was used to validate the role of CD39. **H**, The proportion CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs from paired blood and breast tumor ( $n = 11$ ) or ovarian tumor ( $n = 4$ ) samples analyzed by FC (statistical analysis, two-way ANOVA). **I**, Single-cell suspensions of breast tumor ( $n = 12$ ) and ovarian tumor ( $n = 7$ ) were reactivated with PMA/ionomycin, and single cytokine production (TNFα, IL2, IFNγ, and IL17A) and coproduction of IFNγ and IL17A were analyzed by FC after gating on CD73<sup>+</sup> (black circles) or CD73<sup>neg</sup> (white circles) Teffs (statistical analysis, two-way ANOVA). **J**, Localization of Tregs (FoxP3<sup>+</sup>) and CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs was analyzed in frozen human breast tumor section by multi-immunofluorescence stainings. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, nonsignificant.



**Figure 7.** CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells express less i-ICPs. **A**, Representative expression of i-ICPs (TIGIT, CTLA-4, TIM-3, PD-1) and CD73 on CD4<sup>+</sup> T cells from patients with cancer blood (blood-Teff) and paired tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells (Ti- CD4<sup>+</sup> T cell), analyzed by FC. **B**, Expression of i-ICPs on CD73<sup>+</sup> (black) and CD73<sup>neg</sup> (white) CD4<sup>+</sup> T cells (statistical analysis, two-way ANOVA). **C**, Pie chart representing the expression and coexpression of i-ICPs (TIGIT, CTLA-4, TIM-3, and PD-1) on CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from breast tumor (n = 10) and ovarian tumor (n = 10) samples. **D**, MFI of i-ICPs (CTLA-4, PD-1, TIGIT, and TIM-3) expressed on CD73<sup>neg</sup> versus CD73<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from breast tumor and ovarian tumor samples (statistical analysis, two-way ANOVA). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P < 0.0001; ns, nonsignificant.

## Discussion

We have herein demonstrated that CD73 expression on CD4<sup>+</sup> T cells delineates polyfunctional memory CD4<sup>+</sup> T cells enriched in

Th1.17 cells, whereas Tregs are devoid of CD73 expression. CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are targeted by CD39<sup>+</sup> Tregs through ATP degradation into Ado inhibiting and restricting their functionality to IL17A secretion. This contact-independent cooperation induces



Gourdin et al.

specific inhibition of CD73<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> T cells in a spaced-out environment. In breast and ovarian tumor environments, the increased proportion of Tregs overexpressing CD39 and the presence of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells almost devoid of i-ICPs strongly suggest that CD73-mediated generation of autocrine Ado represents an essential regulatory mechanism of these potent CD4<sup>+</sup> T cells.

Our results highlight that, compared with CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, the CD73<sup>+</sup> subset secretes higher levels of proinflammatory cytokines (IL17A, IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL22, TNF $\alpha$ , IL2, IL3), and lower levels of anti-inflammatory ones (IL10, IL13, and IL21). Of importance, FC analyses reveal the higher propensity of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells to coproduce IFN $\gamma$  and IL17A and coexpress CXCR3/CCR6, in line with Th1.17 compared with CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. Our results extend the work of Doherty and colleagues (24), who identified the memory CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells as Th17 cells. Indeed, the exploitation of the transcriptome data from Ramesh and colleagues (27), comparing MDR1<sup>+</sup> and MDR1<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> memory populations (Gene Expression Omnibus repository, accession ID: GSE49702), reveals that *NT5E* mRNA, coding for CD73, is one of the most significantly upregulated genes in the MDR1<sup>+</sup> population [Log<sub>2</sub>-fold change (FC) = 0.867; *P* = 0.004]. Moreover, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells present a number of features of Th1.17 cells recently described by Ramesh and colleagues (27). They express high level of functional MDR1, secrete IL3 and GM-CSF and present higher expression of IL23R in contrast to nonpathogenic Th17 that produce only IL17A, IL22, IL10, and IL21 (26, 27, 34). Altogether, our data emphasize the polyfunctionality of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and their similarity with Th1.17.

Th1.17 cells are known to play a pathogenic role in autoimmune diseases through their production of IFN $\gamma$  and GM-CSF in addition to IL17A (for review; ref. 35). While, Th1.17 cells, also called pathogenic Th17 induced by Gram<sup>+</sup> bacteria influence gut antitumor immune response in murine models (36), information on the impact of this population in breast and ovarian tumors remains limited. In fact, in patients with invasive breast carcinoma, IL17A produced by CD4<sup>+</sup> T cells positively correlates with a high histologic grade and with triple-negative molecular subtype, and represents an independent prognostic factor for shorter disease-free survival (37, 38). In line with these observations, neutralization of IL17 in murine mammary tumor models inhibits tumor growth (39). In contrast, in ovarian carcinoma, the detection of IL17 within the tumor microenvironment (40), and more precisely the presence of CD4<sup>+</sup> T cells coexpressing IL17 and IFN $\gamma$  (41), is associated with a good prognosis. Owing to their capacity to produce IFN $\gamma$ , these cells can exert a potent tumor suppressive activity in synergy with IL17 to reprogram recruited neutrophils and myeloid-derived suppressor cells into potent antitumor effectors, and to neutralize the proangiogenic effects of IL17 through the production of the CXCR3 ligand (CXCL10; ref. 41). This is in line with the strong antitumor response associated to Th1.17 cells in murine ovarian tumor model (28, 41).

Of importance, we observe that Ado blocks all cytokines produced by CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, except IL17A. In this context, the analysis of cytokine pattern in 102 human breast and ovarian tumor mechanic disaggregation milieu (STM: soluble tumor milieu) with sensitive method highlight that 51% (*n* = 52) STM were negative for both IL17A and IFN $\gamma$ , 28.4% (*n* = 29) contained only IL17A, whereas 18.6% (*n* = 19) contained both IL17A and IFN $\gamma$  and 2.9% (*n* = 3) IFN $\gamma$  only. As CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were

detected in most tumors at a frequency similar to blood and preserve their capacity to coproduce IL17A and IFN $\gamma$  upon PMA + ionomycin activation (Fig. 6), these STM data suggest that the level of endogenous Ado production may vary from tumor to tumor, a high level of Ado production leading to IL17A only, while a low Ado level allowing both IL17A and IFN $\gamma$  coproduction. Moreover, 87.5% of STM producing both IL17A and IFN $\gamma$  contained high concentrations of CXCL10 (>8 ng/mL), whereas only 12.5% of those with IL17A only and none of the other contained significant levels of CXCL10. This represents another argument that IL17/IFN $\gamma$  found in STM may be coproduced by CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> Th1.17 CD73<sup>+</sup> T cells. Further analyses remain necessary to confirm this.

Importantly, we demonstrate that in the presence of exogenous ATP, CD39<sup>+</sup> Tregs potently inhibit the proliferation and cytokine production of purified CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells through CD73-dependent Ado generation without impacting CD73<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. These results support the concept that the potent CD73<sup>+</sup>Th1.17 cells are selectively inhibited by CD39<sup>+</sup> Tregs, through the cooperative production of Ado in their local microenvironment. The localized effect of Ado can be explained by its short half-life in tissues due to the presence of ADA and specific membrane transporters (42).

High ATP concentrations released in the tumor microenvironment (1) play an important role in the initiation of the immune response, whereas Ado, also found in human tumor environment (43), fosters tumor progression through its immunosuppressive functions (for review; ref. 2).

In this study, we confirm the increase in Tregs proportion in breast and ovarian tumor environment (18, 19) and demonstrate an overexpression of CD39 on these tumor-infiltrating Tregs (frequency of CD39<sup>+</sup> Tregs within total CD4<sup>+</sup> T cells, about 4 folds in tumor compared with blood), which efficiently degrades exogenous ATP into AMP. Consequently, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells will be inhibited through autocrine Ado production. These results support the concept that the Th1.17 potency of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells can be selectively inhibited by tumor-infiltrating CD39<sup>+</sup> Tregs through cooperative Ado production. Other CD39-expressing cells such as M $\phi$  or B cells may also contribute to the regulation of this CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (44, 45).

Of further relevance for therapy, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from blood or tumor present a high expression of the functional multidrug transporter MDR1, suggesting their protection from deleterious effects of chemotherapy, thus strengthening the role they could play in the antitumor immunity. This key property could be evaluated through the analysis of the proportion of these CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells following neoadjuvant chemotherapy. Furthermore, CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells express very low levels of i-ICPs (PD-1, TIM-3, TIGIT, and CTLA-4), suggesting the nonredundancy of i-ICPs and the adenosinergic pathway in the regulation of these cells. These results corroborate recent reports, in murine tumor models, demonstrating that Ado limits the efficacy of immunotherapeutic interventions targeting CTLA-4 or PD-1/PDL-1, and that CD73 neutralization enhances the efficacy of these therapies (16, 17). Thus, CD73-mediated generation of Ado is an important mechanism of regulation of these polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, and may represent a critical resistance mechanism to current immunotherapies (anti-PD-1/L1 and CTLA-4). These findings should promote the development of combined therapies based on immunotherapies targeting i-ICPs and the neutralization of the enzymatic function of CD73 (46, 47).

Furthermore, clinical investigations are required to evaluate the presence of CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs in primary or chemotherapy-treated tumors and their clinical impact on the survival of the patients in association with the presence of CD39<sup>+</sup> cells such as Tregs or Mφ.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Authors' Contributions

**Conception and design:** N. Gourdin, C. Machon, J. Faget, P. Romero, C. Caux, C. Ménétrier-Caux

**Development of methodology:** N. Gourdin, C. Rodriguez, S. Viganò, J.C. Marie, J. Guitton, C. Ménétrier-Caux

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** N. Gourdin, M. Bossennec, S. Viganò, C. Machon, C. Jandus, D. Bauché, N. Chopin, O. Tredan, J.C. Marie, J. Guitton

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** N. Gourdin, M. Bossennec, S. Viganò, C. Machon, C. Jandus, C. Ménétrier-Caux

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** N. Gourdin, M. Bossennec, S. Viganò, C. Jandus, O. Tredan, J.C. Marie, B. Dubois, P. Romero, C. Caux, C. Ménétrier-Caux

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** C. Rodriguez, D. Bauché, I. Durand, C. Ménétrier-Caux

**Study supervision:** N. Gourdin, C. Caux, C. Ménétrier-Caux

### Acknowledgments

C. Caux, C. Ménétrier-Caux, N. Gourdin, M. Bossennec, B. Dubois, and C. Rodriguez were financially supported by the Breast Cancer Research Foundation, and grants from the Puy de Dôme comity of the "Ligue Contre le Cancer." J.C. Marie, D. Bauché, C. Caux, C. Ménétrier-Caux, B. Dubois, N. Gourdin, M. Bossennec and C. Rodriguez, O. Tredan, I. Durand and N. Chopin were financially supported by the SIRIC project (LYRIC, grant no. INCa\_4664). C. Caux, C. Ménétrier-Caux, N. Gourdin, M. Bossennec and C. Rodriguez, P. Romero, C. Jandus and S. Viganò were financially supported by the FP7 European TumAdoR project (grant no. 602200). J.C. Marie, D. Bauché, and C. Caux were financially supported by the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of the University of Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" organized by the French National Research Agency (ANR). We wish to thank the staff of the core facilities at the Cancer Research Center of Lyon (CRCL) for their technical assistance and the BRC (Biological Resources Centre) of the CLB for providing human samples. Drs. P. Guibert, F. Desseigne, M. Sarabi, and L. Mais are acknowledged for their clinical expertise. We will also thank Marie Laure Thibult (Innate Pharma) for her assistance for flow cytometry sorting. We are very grateful to Justine Berthet for her help and expertise in the development of multi-IF analysis on breast tumor sections. We would also like to thank Dr. B. Manship for critical reading of the manuscript.

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

Received August 20, 2017; revised February 8, 2018; accepted March 16, 2018; published first March 20, 2018.

### References

- Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di VF. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 2008;3:e2599.
- Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 2011;11:201–12.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257–65.
- Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res* 2011;71:2892–900.
- Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2371–82.
- Ohta A. A metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment. *Front Immunol* 2016;7:109.
- Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 2000;14:2065–74.
- Hasko G, Kuhel DG, Salzman AL, Szabo C. ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-α release from macrophages. *Br J Pharmacol* 2000;129:909–14.
- Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-α, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 1996;157:4634–40.
- Le MO, Stordeur P, Schandené L, Marchant A, de Groote D, Goldman M, et al. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 1996;156:4408–14.
- Hirschhorn R, Vavter GF, Kirkpatrick JA Jr., Rosen FS. Adenosine deaminase deficiency: frequency and comparative pathology in autosomally recessive severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1979;14:107–20.
- Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashov D, Wong MKK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13132–7.
- Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1547–52.
- Terp MG, Olesen KA, Arnsperg EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, et al. Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J Immunol* 2013;191:4165–73.
- Zhang B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncimmunology* 2012;1:67–70.
- Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* 2013;19:5626–35.
- Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res* 2014;4:172–81.
- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
- Alam MS, Kurtz CC, Rowlett RM, Reuter BK, Wiznerowicz E, Das S, et al. CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and Helicobacter felis-induced gastritis in mice. *J Infect Dis* 2009;199:494–504.
- Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, Ren J, Jackson EK, Johnson JT, et al. Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J Biol Chem* 2010;285:27571–80.
- Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant* 2010;10:2410–20.
- Schuler PJ, Schilling B, Harasymczuk M, Hoffmann T, Johnson J, Lang S, et al. Phenotypic and functional characteristics of ATP-hydrolysing CD4<sup>+</sup> CD39<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD39<sup>+</sup> FOXP3<sup>neg</sup> T-cell subsets in patients with cancer. *Eur J Immunol* 2012;42:1876–85.

Gourdin et al.

24. Doherty GA, Bai A, Hanidziar D, Longhi MS, Lawlor GO, Putheti P, et al. CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2012;42:3062–72.
25. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 2012;13:991–9.
26. Duhon T, Campbell DJ. IL-1 $\beta$  promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6+CXCR3+ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. *J Immunol* 2014;193:120–9.
27. Ramesh R, Kozhaya L, McKeivitt K, Djuretic IM, Carlson TJ, Quintero MA, et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* 2014;211:89–104.
28. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008;112:362–73.
29. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 2008;226:160–71.
30. Machon C, Bordes C, Cros-Perrill E, Clement Y, Jordheim LP, Lanteri P, et al. Use of designed experiments for the improvement of pre-analytical workflow for the quantification of intracellular nucleotides in cultured cell lines. *J Chromatogr A* 2015;1405:116–25.
31. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245–53.
32. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 2012;484:514–8.
33. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–17.
34. Viaud S, Daillère R, Boneca IG, Lepage P, Langella P, Chamaillard M, et al. Gut microbiome and anticancer immune response: really hot Sh\*t!. *Cell Death Differ* 2015;22:199–214.
35. Benevides L, Cardoso CR, Tiezzi DG, Marana HR, Andrade JM, Silva JS. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur J Immunol* 2013;43:1518–28.
36. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su JJ, Chen HH. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology* 2013;63:225–33.
37. Benevides L, da Fonseca DM, Donate PB, Tiezzi DG, De Carvalho DD, de Andrade JM, et al. IL17 promotes mammary tumor progression by changing the behavior of tumor cells and eliciting tumorigenic neutrophils recruitment. *Cancer Res* 2015;75:3788–99.
38. Lan C, Huang X, Lin S, Huang H, Cai Q, Lu J, Liu J. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res* 2013;352:351–9.
39. Kycyzek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009;114:1141–9.
40. King AE, Ackley MA, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:416–25.
41. Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 1997;57:2602–5.
42. Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 1991;146:2235–44.
43. MacKenzie WM, Hoskin DW, Blay J. Adenosine suppresses alpha(4)beta(7) integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to colon adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 2002;276:90–100.
44. Geoghegan JC, Diedrich G, Lu X, Rosenthal K, Sachsenmeier KF, Wu H, et al. Inhibition of CD73 AMP hydrolysis by a therapeutic antibody with a dual, non-competitive mechanism of action. *MAbs* 2016;8:454–67.
45. Giraudon-Paoli M, Augier S, Blemont MR, Rodriguez C, Blanc HR, Chanteux S, et al. Discovery and characterization of new original blocking antibodies targeting the CD73 immune checkpoint for cancer immunotherapy[abstract]. In: Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16–20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; 2016. Abstract nr 2344.
46. Verronese E, Delgado A, Valladeau-Guilemond J, Garin G, Guillemaut S, Tredan O, et al. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay. *Oncoimmunology* 2016;5:e1100791.
47. Dimeloe S, Frick C, Fischer M, Gubser PM, Razik L, Bantug GR, et al. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2014;44:3614–20.

# Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

## Autocrine Adenosine Regulates Tumor Polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Effector T Cells Devoid of Immune Checkpoints

Nicolas Gourdin, Marion Bossennec, Céline Rodriguez, et al.

*Cancer Res* 2018;78:3604-3618. Published OnlineFirst March 20, 2018.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-17-2405](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2405)

**Supplementary Material** Access the most recent supplemental material at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2018/03/20/0008-5472.CAN-17-2405.DC1>

**Cited articles** This article cites 46 articles, 19 of which you can access for free at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13/3604.full#ref-list-1>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

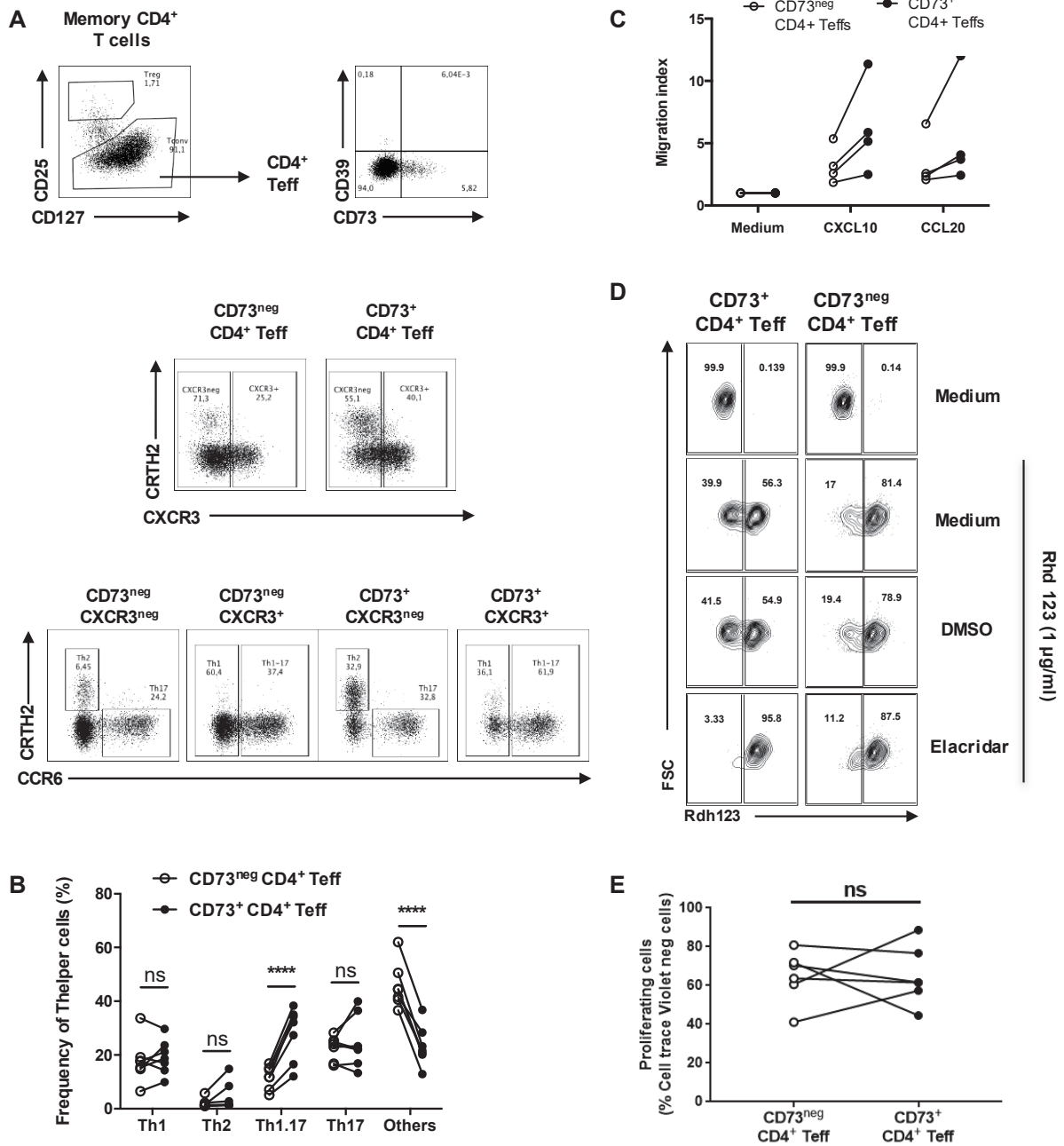
**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, use this link <http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13/3604>. Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

## ***Supplementary material and figures***

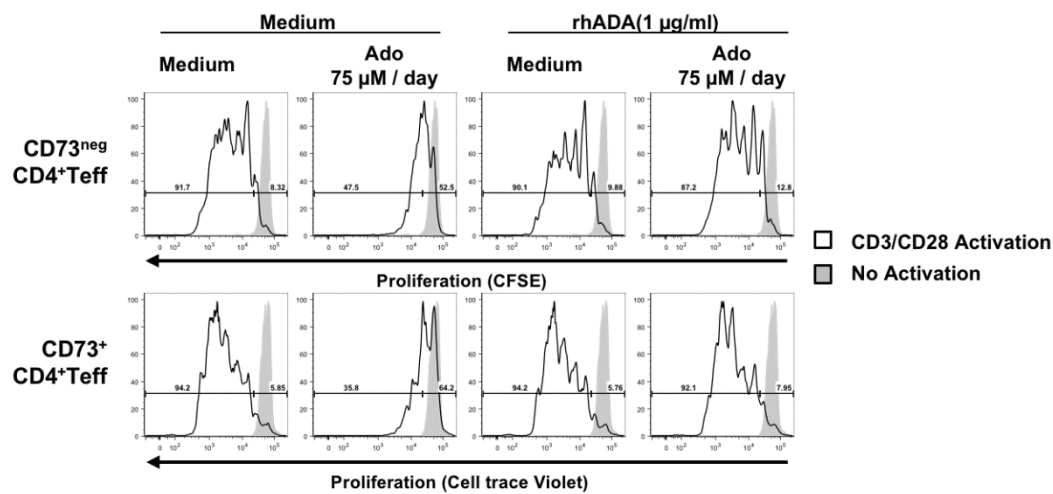
### *Migration assay*

Memory CD4<sup>+</sup> T cells were suspended at  $1 \cdot 10^5$  cells/well in 100  $\mu$ L of RPMI medium 1640 containing 10% FCS and loaded into 5- $\mu$ m pore size inserts (6.5-mm diameter, Costar) that were placed in 24-well plates containing 400  $\mu$ L control medium or medium with human recombinant CXCL10 (100ng/ml) or CCL20 (10ng/ml) (R&D Systems). After 1 hour of incubation at 37°C, the migrated cells were collected and the migration of different subsets was quantified by multi-parametric staining cells for gating on purified CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> or CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tregs. The migration index was calculated by the ratio of the number of CD4<sup>+</sup> Tregs that migrated in the presence of chemokine to the number of cells that migrated in control medium.

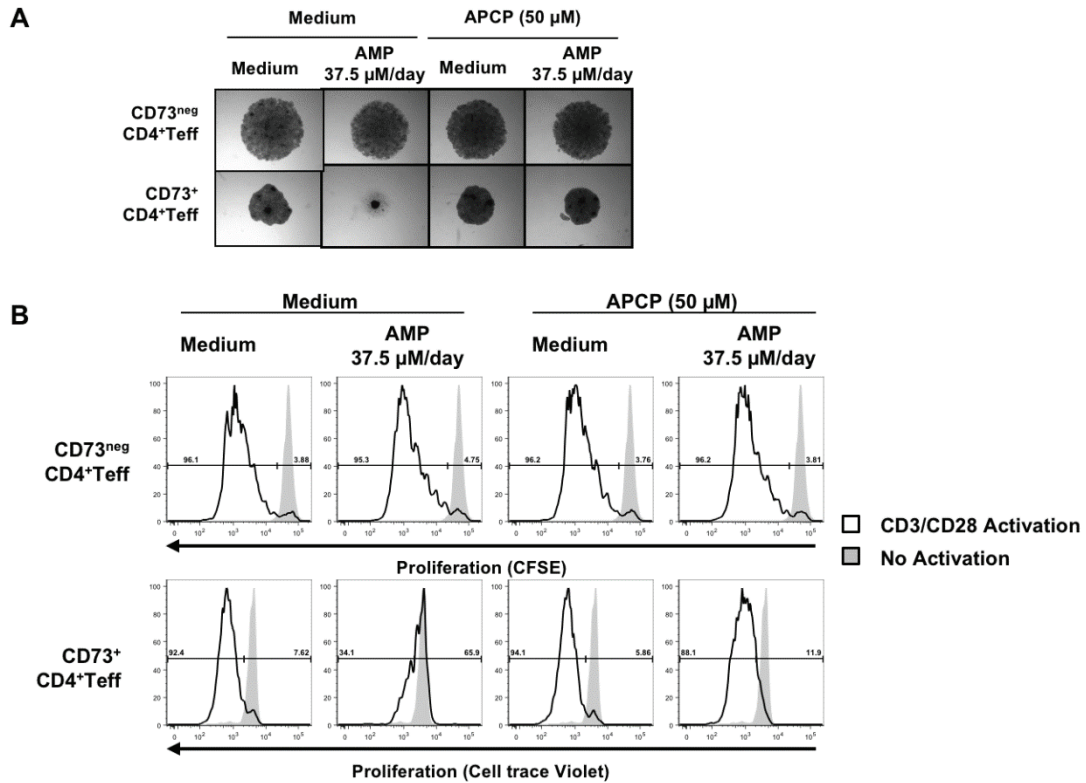


**Supplementary Figure 1:** (A) Gating strategy by FC for the determination of T helper subsets among CD4<sup>+</sup> Teffs (CD45RO<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>). Th1, Th1.17, Th2 and Th17 were respectively defined as CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>neg</sup> cells, CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> cells, CXCR3<sup>neg</sup>CCR6<sup>neg</sup>CrTh2<sup>+</sup> cells and CXCR3<sup>neg</sup>CCR6<sup>+</sup>CrTh2<sup>neg</sup> cells. (B) CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (black) and CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> (white) Teffs were analyzed for their T helper composition (Th1, Th2, Th1/17, Th17) (statistical analysis: Two-way ANOVA). (C) Migration of CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs among CD4 memory T cells toward a CXCL10 (100ng/ml) or CCL20 (10ng/ml) gradient were analyzed in a Transwell assay. Migration index ([Number of migrated cells in response to the chemokine / Number of migrated cells in medium condition] x 100). (D) MDR-1 functionality was

assessed by FC on CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs using Rhd123 (1 µg/ml) in the presence or absence of a MDR-1 specific inhibitor (Elacridar, 1µM) or vehicle (DMSO). (E) The percentage of proliferating cells among CD73<sup>neg</sup> and CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs was determined by the percentage of Cell trace Violet negative cells by FC (n=6) (statistical analysis : Wilcoxon test).

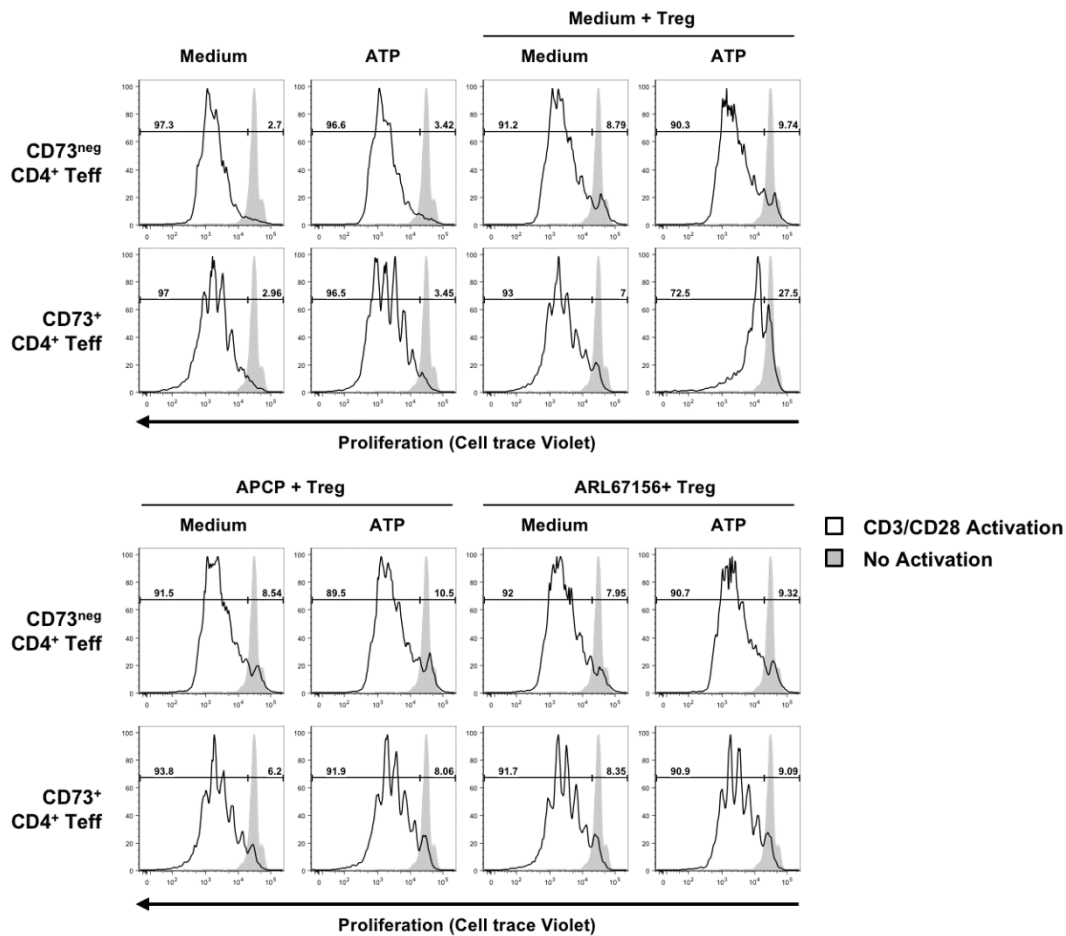


**Supplementary Figure 2:** The impact of Ado (75 µM/day) on the proliferation of purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs after stimulation with Expand beads (1:4) was assessed by the analysis by FC of the proliferation markers (CFSE: CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs and CTV: CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs) dilution at day 4. Cells were pre-incubated for 30 minutes with rhADA (1 µg/ml) before adding Ado when specified. Data are representative of three independent donors.

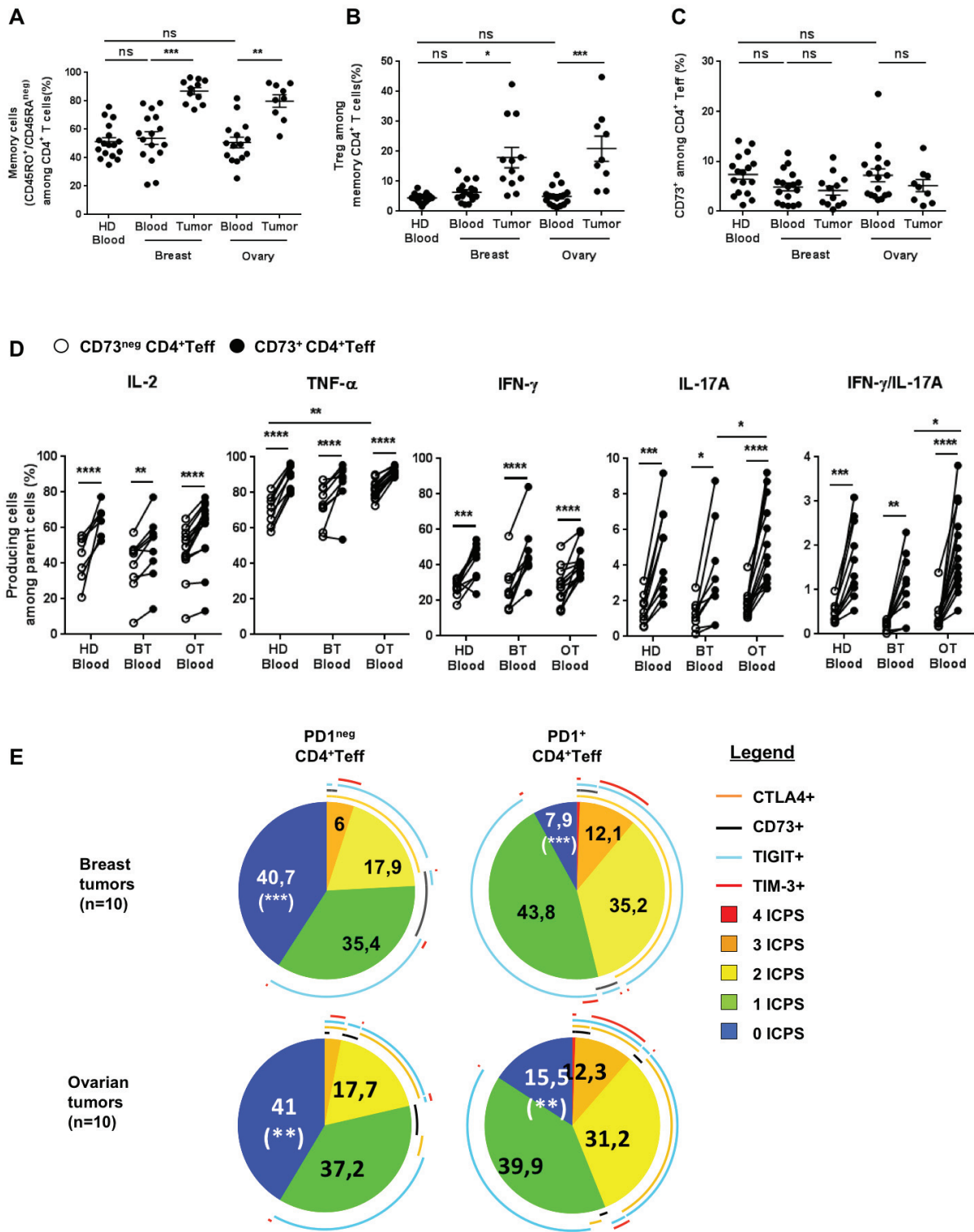


**Supplementary Figure 3:** The impact of AMP (37.5  $\mu$ M/day) on the proliferation of purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Teffs after stimulation with Expand beads (1:4) was analyzed at day 4 by microscopy (A) and was assessed by the analysis by FC of the proliferation markers (CFSE: CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs and CTV: CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teffs) dilution at day 4 (B). In some conditions, cells were pre-incubated for 30 minutes with the CD73 inhibitor (APCP, 50  $\mu$ M) before AMP addition. Data are representative of three independent donors.





**Supplementary Figure 4:** The impact of ATP (18.75  $\mu\text{M}/\text{day}$ ) on the proliferation of purified CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> T effs alone, or in co-culture with Tregs at a ratio of 1:1 after stimulation with Expand beads (1:4) was assessed by the analysis by FC of the proliferation markers (CFSE: CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> T effs and CTV: CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T effs) dilution. Their pre-incubation with inhibitors of CD73 (ACPC: 50  $\mu\text{M}$ ) and CD39 (ARL-67156: 250  $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes was used to assess the impact of CD73 and CD39.



**Supplementary Figure 5:** (A) The frequency of memory cells among total CD4<sup>+</sup> T cells was analyzed by FC in HD- BT- or OT-blood, or in cells from primary BT and OT tumors (statistical analysis: two-way ANOVA). (B) Frequency of Tregs among memory CD4<sup>+</sup> T cells from HD-blood or patient's blood, and from BT or OT tumor cell suspensions were analyzed by FC (statistical analysis: Kruskal-Wallis). (C)

Frequency of CD73<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> Tregs from HD-Blood, BT-Blood and OT-Blood was analyzed by FC (statistical analysis: Kruskal-Wallis Test). (D) PBMC from HD-Blood, BT-Blood and OT-Blood were reactivated with PMA/Ionomycin in presence of an inhibitor of Golgi Transport (Golgi Plug) and cytokine production (TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-17A) or coproduction (IFN- $\gamma$ /IL-17A) were analyzed by FC gating on CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs (statistical analysis: Two-way ANOVA). (E) MFI of i-ICPs (CTLA-4, TIGIT, TIM-3) and CD73 expressed on PD1<sup>neg</sup> versus PD1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Tregs from BT and OT samples (statistical analysis: Two-way ANOVA).

## II. ETUDE DES SOUS POPULATIONS TH EXPRIMANT CD73 AVANT ET SOUS TRAITEMENT PAR METHOTREXATE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE PR OU DE RPSO

Bossennec M., Rodriguez C., Hubert M., Couturier M., Marotte H., Caux C., Coury- F. <sup>✉</sup>  
and Ménétrier-Caux C. <sup>✉</sup> (<sup>✉</sup> : Co-last authorship)

### ***Manuscrit en préparation***

“Methotrexate resets sensitivity to Treg through restoration of CD73 expression on pro-inflammatory Th1.17 in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients”

Le Méthotrexate rétablit la sensibilité aux Treg via la restauration de l’expression de CD73 sur les Th1.17 pro-inflammatoires chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et de rhumatisme psoriasique

### **Résumé**

Une meilleure compréhension des mécanismes immunobiologiques à l’origine de l’inflammation chronique caractérisant la polyarthrite rhumatoïde (PR) et l’arthrite psoriasique (RPso) est un enjeu clinique important. L’identification de marqueurs pour évaluer la sévérité de ces pathologies ou la réponse aux traitements ainsi que le design de nouvelles combinaisons thérapeutiques motivent notamment ces investigations. L’IL-17A, cytokine pro-inflammatoire produite par les Th17 et les Th1.17 polyfonctionnels joue notamment un rôle important dans l’établissement et le maintien d’un fort niveau d’inflammation chronique. Une forte activité des populations Th17 et Th1.17 a notamment été rapportée dans le LS de patients atteints de PR et corrèle avec la sévérité de la pathologie. Chez des patients atteints de RPso, les Th17 ont été clairement identifiés alors que les Th1.17 demeurent peu étudiés. L’hyper-activation de ces cellules résulte en partie d’un défaut dans les mécanismes de régulation de leurs fonctions pro-inflammatoires. Notre équipe a récemment démontré que CD73 identifie une population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs (Teff) enrichis en Th1.17. Le méthotrexate (MTX) est classiquement utilisé en première intention dans le traitement de la PR et du RPso et est notamment capable d’augmenter la concentration extracellulaire en AMP et en Adénosine (Ado) qui contribuent à son activité anti-inflammatoire.

Dans cette étude, nous avons évalué l’expression de CD73 sur les sous-populations de Teff dans le sang périphérique de patients atteints de PR ou de RPso avant et sous traitement par MTX. Nous avons mis en évidence une diminution de l’expression de CD73 sur les Th1.17 et les Th1 chez les patients non traités. Cette expression est en partie restaurée sous traitement par MTX. Notre étude détaille un peu plus l’action de MTX sur la modulation des populations Th *via* une abrogation Ado-dépendante de l’inflammation dans la PR et le Rpsso.



# **Methotrexate resets sensitivity to Treg through restoration of CD73 expression on pro-inflammatory Th1.17 in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients**

**Marion Bossennec<sup>\*1,2</sup>, Céline Rodriguez<sup>1,2</sup>, Margaux Hubert<sup>1,2</sup>, Mathilde Couturier<sup>3</sup>, Hubert Marotte<sup>4,5</sup>, Christophe Caux<sup>1,2</sup>, Fabienne Coury<sup>⊗ 3,6</sup> and Christine Ménétrier-Caux<sup>⊗ 1,2</sup>** (⊗ Co-last authorship)

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon (CRCL) Lyon, 69008, France

<sup>2</sup>Team “*Therapeutic targeting of the tumor cells and their immune stroma*”, Immunology Virology Inflammation (IVI) department, INSERM U-1052, CRCL, 69008 Lyon, France

<sup>3</sup>Rheumatology department, Lyon Sud Hospital, 69152 Pierre-Bénite, France

<sup>4</sup>Rheumatology department, CHU Saint-Etienne, 42000 Saint-Etienne, France

<sup>5</sup>INSERM U1059, Université Jean Monnet, 42000 Saint-Etienne, France

<sup>6</sup>INSERM, UMR 1033, Claude Bernard Lyon 1 University, 69008 Lyon, France

**Corresponding author** : Christine MENETRIER-CAUX, CRCL, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69373 Lyon Cedex 08, France. E-mail : christine.caux@lyon.unicancer.fr; Tel :+33 4 78 78 27 50

## **Abstract**

Objectives: Better understanding the immune-biological mechanisms at the inflammation roots characterizing Rheumatoid arthritis (RA) and Psoriatic arthritis (PsA) may help identify markers to assess disease severity and response to treatment and design new therapeutic combinations. The pro-inflammatory cytokine IL-17A produced by Th17 and Th1.17 plays important roles in the establishment and upkeep of high level of chronic inflammation. In addition, Th1.17 are more polyfunctional and more harmful than classical Th17 as they co-produce IFN- $\gamma$ . Th17 and Th1.17 seem to play different role in RA and PsA physiopathology. Hyper activation of these cells results partly from a deficiency in regulatory mechanisms of their pro-inflammatory functions. Our team recently demonstrated that CD73 highlights CD4<sup>+</sup> effector T cells (Teff) enriched in Th1.17 features. Methotrexate (MTX) is usually used as first line treatment of RA and PsA and increases extracellular AMP and Ado concentrations, contributing to MTX anti-inflammatory function.

In this study, we investigated CD73 expression by multi-parametric flow cytometry on Teff subsets and their functionality in blood of RA and PsA patients before and under MTX treatment.

Results: We showed a decreased CD73 expression on Th1.17 and Th1 in untreated patients that was partly restored under MTX. CD73<sup>+</sup> Teff remained functional under MTX treatment

but the re-expression of CD73 on these pro-inflammatory cells can help control their activation.

**Conclusion:** Our study suggests uncovered mode of action of MTX on Teff subsets modulation and in the Ado-dependent abrogation of inflammation in RA and PsA.

**Keywords:** *rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, Methotrexate, Th1.17, CD73.*

## **Introduction**

Rheumatoid Arthritis (RA) and Psoriatic Arthritis (PsA) are chronic inflammatory disorders characterized by tenderness and swelling in the joints. If not treated, both can lead to bone erosion resulting in joint destruction due to osteoclasts activation. RA is an autoimmune systemic disease characterized by the presence in the periphery of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) and rheumatoid factor (RF)<sup>1</sup>. The presence of psoriasis (Pso) precedes the development of PsA in about 80% of patients<sup>2</sup>. In both cases, study of the immune infiltrate of inflamed joints has shed light on particularly deleterious memory CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes (Th): Th17 and Th1.17<sup>3-5</sup>. These cells, found enriched at the inflamed site, secrete high amounts of the pro-inflammatory cytokine IL-17A, responsible for many features reported in both RA and PsA. IL-17A indeed contributes to the recruitment of pro-inflammatory monocytes and neutrophils at the site of inflammation, and promotes the transformation of the fibroblast-like synoviocytes present in the synovial lining of the articulation toward a pro-inflammatory phenotype<sup>6-8</sup>. In the presence of IL-17A, these cells secrete IL-6 and TNF- $\alpha$ <sup>9</sup> and high levels of RANKL, which in turn stimulate osteoclast differentiation<sup>10</sup>. IL-17A is therefore implicated in the positive feedback loop at the roots of the chronic inflammation and bone destruction observed in affected joints. Moreover, in RA and PsA, T cells display reduced sensitivity to the diverse immune inhibition functions exerted by regulatory T cells (Treg)<sup>11</sup>. Treg are notably involved in the modulation of levels of extracellular purine derivatives through their membrane expression of the ecto-enzyme CD39, which degrades pro-inflammatory extracellular ATP into AMP. AMP can, in turn, be degraded into immunosuppressive adenosine (Ado) by the ecto-nucleotidase CD73. We recently demonstrated that in human, Treg only express CD39 and thus can't produce Ado without cooperating with CD73 expressing cells<sup>12</sup>. CD73 is in particular expressed by a fraction of non-regulatory CD4<sup>+</sup> memory T cells (Teff) strongly enriched in Th1.17 and Th17<sup>12</sup>. We showed that CD73 expression by the Th1.17 effectors make them selectively sensitive to Ado through their cooperation with CD39<sup>+</sup> Treg for extracellular ATP degradation. In the context of chronic inflammation, modulation of the expression of these ecto-enzymes on Teff and thus of Ado production could therefore contribute to the regulation of T cell activation.

RA and PsA treatment options are mainly composed of an arsenal of disease modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) among which Methotrexate (MTX) is still largely used due to its

efficiency, low toxicity and cost effectiveness. Used at low doses (5-20mg/week), MTX inhibits the 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformylase enzyme (ATIC)<sup>13,14</sup>. AICAR, consequently found mostly under its free form, antagonizes intracellular AMP-deaminase (AMPDA) and adenosine-deaminase (ADA) activity. As a consequence, increased extracellular AMP and Ado concentrations are observed following low dose MTX treatment<sup>15</sup> and anti-inflammatory properties of MTX partly rely on the immune inhibition mediated by increased Ado production as demonstrated in mice<sup>16</sup>. Extracellular Ado indeed takes part in the inhibition of T cell activation and proliferation through the engagement of its A2A and A2B receptors which expression is upregulated on activated T cells<sup>12,17,18</sup> and through the amplification of Treg expressing A2AR<sup>19</sup>.

In this study, we evaluated the presence and distribution of the recently described CD73<sup>+</sup> Teff among Th populations in the blood of untreated RA and PsA patients. We also assessed the functionality of CD73<sup>+</sup> Teff in patients in comparison to healthy donors' blood. We further appraise the impact of MTX treatment on this population. We showed that CD73 expression level reflects the active state of this population and may represent a therapeutic target worth considering in the treatment of RA by restoring and stabilizing it through an immunosuppressive feedback loop enabling Ado production.

## **Patients and Methods**

### *Patients*

Patients aged  $\geq 18$  years, naïve of biologics, with RA fulfilling the American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism 2009 criteria<sup>20</sup> or with confirmed PsA fulfilling the Classification of PsA criteria<sup>21</sup> were enrolled in the LADORIC study approved by ethics committee of our institution and patients' written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. Clinical and biological information were collected prospectively (**Table 1**). The severity of the disease was assessed using the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28-CRP) for RA and CRP for PsA at baseline visit and 3 or 6 months after MTX treatment onset. DAS28-CRP $\geq 3.2$  in untreated RA patients and CRP $\geq 6$ mg/ml in untreated PsA patients were set as threshold for high disease activity. Samples of venous blood and, when available, synovial fluid (SF) were collected for each patient before the onset of MTX (untreated patients) or during the course of MTX treatment (MTX-treated patients).

Blood from age- and sex-matched anonymous healthy donors (HD) were obtained from the Etablissement Français du Sang.



	<b>RA patients n= 21</b>	<b>PsA patients n= 14</b>	<b>Healthy controls n= 12</b>
Gender f/m, n	16/5	8/6	8/4
Age, y	55 [22-82]	52 [31-79]	49 [25-69]
DAS28	Untreated: 4.1 [1.6-6.4] MTX treated: 3.2 [1.8-5.1]	-	-
CRP (mg/ml)	Untreated 13.6 [0.6-60] MTX treated 3.3 [0.5-9]	Untreated 16.4 [2.6-88] MTX treated 3.8 [1.3-6 ]	-
Mean MTX treatment duration (months)	9.3 [3-22]	6 [3-22]	-
MTX doses (mg/week)	[15-20]	[15-20]	-
RF, n	18(+)/3(-)	-	-
ACPA, n	20 (+)/1 (-)	-	-
Data presented as [range]. RA. Rheumatoid Arthritis; PsA: Psoriatic Arthritis; DAS28: 28 joints activity score; RF: Rheumatoid Factor; ACPA: antibodies against cyclic citrullinated peptides. Two RA patients under MTX treatment also received cortancyl (7.5mg).			

**Table 1:** Characteristics of RA and PsA patients enrolled in the study.

#### *PBMC and SFMC isolation*

Blood samples were centrifuged to collect plasmas, which were stored frozen before cytokine quantification. Then, PBMC were purified by Ficoll (Eurobio) density gradient centrifugation. HBSS (LifeTechnologies) -diluted SF samples containing 10mM EDTA (Sigma), were processed as blood samples to isolate SFMC.

#### *Flow cytometry analyses*

Multi-parametric Flow Cytometry (FC) stainings were performed on PBMC or SFMC from RA and PsA patients using different panels described in **Table 2** (Panel A and B) to assess CD73 expression on total memory T cells and within Th subsets. When specified, proliferation was assessed using an anti-human anti-Ki67 antibody (Ki-67, Biolegend). For FoxP3 intracellular staining, cells were treated using the FoxP3 Fixation and Permeabilization kit (Life Technologies), according to manufacturer instructions. Stainings were analyzed on a LSR-Fortessa (BD Biosciences) with conserved settings throughout the entire study and data were analyzed using FlowJo Software (Tree Star v10.4).

#### *Analysis of cytokines production capacity after reactivation*

PBMC were activated with PMA and Ionomycin (Sigma-Aldrich) as previously described<sup>12</sup> and intracellular cytokines (IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-22) produced by CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff were analyzed using the specific panel described in **Table 2** (Panel C). Stainings were analyzed

on a LSR-Fortessa and Teff poly-functionality was evaluated using the Boolean method (FlowJo software) and then processed using Pestle and SPICE v5.3 softwares.

### *Cytokine quantification in plasma*

After treatment of plasmas with Heteroblock® (3µg/mL, Omega Biologicals) to avoid unspecific heterophilic binding resulting from presence of RF<sup>22</sup>, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17A, IL-21, IL-22 were quantified using U-Plex kits (Meso Scale Discovery) according to manufacturers' instructions.

<b>Panel A</b>	<b>Panel B</b>	<b>Panel C</b>
CD3 (UCHT1), BD Biosciences	CD3 (UCHT1), BD	CD3 (UCHT1), BD
CCR7 (150503), BD Biosciences	CD45RA (HI100), Biolegend	CD4 (RPA-T4), Invitrogen
CD45RA (HI100), Biolegend	CCR6 (11A9), BD Biosciences	CD45RA (HI100), Biolegend
CD8 (RPA-T8) Beckman Coulter	CXCR3 (REA232), Miltenyi	IL-17A (N49-653), BD Biosciences
CD4 (RPA-T4), Invitrogen	CD4 (RPA-T4), Invitrogen	TNF-α (MAb11), BD Biosciences
CD39 (A1), Invitrogen	CD39 (A1), Invitrogen	IFN-γ (4S. B3), Biolegend
CD73 (AD2), Invitrogen	CD73 (AD2), Invitrogen	IL-22 (22URTI), Invitrogen
FoxP3 (PCH01), Invitrogen	FoxP3 (PCH01), Invitrogen	CD73 (AD2), Invitrogen

**Table 2:** Panels of antibodies used for multi-parametric flow cytometry analysis

### *Statistical analysis*

Data formatting and statistical tests were performed using Prism software (Graphpad Inc.). Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test and ANOVA2 were used when comparing unpaired data according to the parameters considered. Wilcoxon test and ANOVA2 with paired values were performed to analyze patients' data follow up.

## **Results**

### ***Activated Th1.17 from peripheral blood of untreated RA and PsA patients express lower levels of CD73***

Total memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells frequencies were not modified in peripheral blood of untreated RA and PsA patients compared to HD (**Supp Fig. 1A**), neither were frequencies of Th subpopulations based on their phenotype (CCR6 and CXCR3 expression)<sup>23</sup> (**Fig. 1A**). Treg frequency was not altered either in untreated RA and PsA patients' blood (**Fig. 1B**) but in RA

patients they displayed a higher and more homogenous intensity of CD39 expression compared to HD and PsA patients (**Fig. 1C**). Interestingly, we found a significantly lower CD73 expression on total Teff population on RA and PsA patients compared to HD (**Fig. 1D**). Since we established that, in HD, CD73 is enriched in Th1.17 and Th17 phenotype<sup>12</sup>, we stratified on Th subpopulations and evidenced that CD73 expression was significantly decreased on Th1.17 (by 1,5 and 1,4 fold on RA and PsA patients respectively) and Th1 (by 1,9 fold on both RA and PsA patients) (**Fig. 1E**).

Using CD39 as a marker of activation<sup>24,25</sup>, we demonstrated a significantly increased activation of blood-associated Th1.17 and Th17 in RA and PsA patients compared to HD ones (**Fig. 1F**). In parallel, CD73 expression was lost on sorted CD73<sup>+</sup> Teff from HD after 4 days *in vitro* TCR triggering (**Supp Fig. 1F**). Taken together, these results indicate that loss of CD73 expression on Th1.17 associated to high CD39 expression in untreated RA and PsA patients' blood could reflect the activated state of this population. The access to paired samples of PBMC and SFMC for RA and PsA patients before treatment, enabled us to show that the decrease of CD73 expression and CD39 up-regulation on total Teff (**Supp Fig. 1D**) as well as Th1.17 in patients' PBMC (**Fig1.E**) was even more dramatic at the site of inflammation both in RA (**Fig. 1G**) and in PsA (**Supp Fig. 1D**). In addition, proliferating cells (identified as Ki67<sup>+</sup> cells) were exclusively included within CD73<sup>neg</sup> Teff in RA (**Fig. 1H**) and PsA (**Supp Fig. 1C**) SF, reinforcing the absence of CD73 expression by proliferating Teff. In the context of systemic inflammation, the monitoring of CD39/CD73 expression levels in the peripheral blood of patients can therefore be a marker of Teff inflammatory potential, an important parameter in the evaluation of disease activity.

### ***Untreated RA and PsA patients' blood Teff are polyfunctional but less CD73<sup>+</sup> Teff are found among IFN- $\gamma$ /IL-17A secreting cells***

We previously showed that CD73 marks polyfunctional Teff in blood but also in healthy (tonsil, colon) and tumor (breast and ovarian) tissues<sup>12</sup>. No striking modifications in polyfunctionality (IFN- $\gamma$ , IL-17A, and TNF- $\alpha$ ) of CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff was noticed in untreated RA and PsA patients compared to HD (**Fig. 2A**) and global levels of each cytokine was comparable between HD and untreated patients (**Supp Fig. 2A**). Of note, IL-22<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> Teff, which were higher IL-22 producers than CD73<sup>neg</sup> Teff in HD (4.2 $\pm$ 1.3% of CD73<sup>+</sup> Teff vs. 1.8 $\pm$ 0.5% of CD73<sup>neg</sup> Teff) were an even more important source of IL-22 in PsA (9.1 $\pm$ 2.6% of CD73<sup>+</sup> Teff vs. 6.1 $\pm$ 3.9% of CD73<sup>neg</sup> Teff) (**Supp Fig.2B**). In line with phenotypic analyses (**Fig. 1E**), the IFN- $\gamma$ /IL-17A coproducing cells, corresponding to Th1.17, expressed significantly less CD73 (**Fig. 2B**). Interestingly we also evidenced a strong decrease of CD73 expression on IL-22 producing cells in patients compared to HD. Finally, CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff from untreated RA and PsA patients according to their DAS28-CRP or CRP level respectively, showed

enhanced IFN- $\gamma$  and IL-17A production by CD73<sup>+</sup> Teff in patients with active RA (DAS28-CRP $\geq$ 3.2), although not reaching statistical significance (**Fig. 2C**).

### ***Treatment of patients with MTX partially restores CD73 expression on Teff***

Due to described MTX involvement in purine metabolism regulation<sup>15</sup>, we also analyzed the impact of MTX treatment on CD73 expression by Th subpopulations. We indeed recently demonstrated that exogenously added Ado on CD73<sup>+</sup> Teff blocked their proliferation<sup>12</sup>. Moreover, *in vitro*, expression of CD73 is lost on CD73<sup>+</sup> Teff after 4 days TCR-induced proliferation (**Supp Fig 1F**). However, these Teff re-acquired CD73 expression after two days in resting condition (no TCR signaling), demonstrating dynamic CD73 expression at the surface of Teff (**Supp Fig 1F**). In this context, we analyzed CD73 expression on Th subsets in MTX-treated RA and PsA patients with the idea that gain of CD73 expression could reflect drug efficiency on these populations and could contribute to its anti-inflammatory effects. MTX did not impact Th subsets frequencies compared to untreated RA and PsA patients (**Fig. 3A**). However, CD73 expression on Teff was increased in MTX-treated RA patients compared to untreated ones when no clear variation was observed in PsA patients (**Fig. 3B**). Interestingly, in RA patients, CD73 expression was especially increased within Th1.17 (**Fig. 3C**) and overall CD73 expression level tended towards those observed in HD. Finally, analysis of paired patients' blood samples before and under MTX treatment showed significantly increased CD73 levels on Th1 and Th1.17 subsets, the two populations with significantly altered CD73 expression in untreated patients compared to HD (**Fig. 1E**). This impact of MTX was specific of CD73<sup>+</sup> Teff as we didn't notice striking variations in memory CD8<sup>+</sup> T cell frequencies (**Supp Fig. 3A**) nor in Treg or CD39<sup>+</sup> Treg frequencies (**Supp. Fig. 3B, Supp. Fig. 3C**) even in paired samples (**Supp Fig. 3D-3F**).

### ***MTX treatment impacts Teff poly-functionality***

Interestingly, we showed that CD73 expression levels on Teff populations according to their cytokine production after reactivation on MTX-treated patients (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17A<sup>+</sup>, or IL-17A<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), mirrors the results obtained in the phenotypic analysis (**Fig.4A-B**). In addition, we evidenced that MTX treatment significantly increased CD73 frequency among IL-22 producing cells in RA patients (**Fig.4A**). Of note, no major variation on global pattern of cytokines production was detected in RA patients when comparing untreated and MTX-treated samples (**Supp. Fig. 4A**) and a rather modest increase of IL-17A<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17A<sup>+</sup> coproducing cells was observed in MTX-treated PsA patients compared to untreated ones (**Supp. Fig.4.B**). CD73<sup>neg</sup> Teff functionality was not altered by MTX neither in RA nor in PsA patients (**Fig. 4C and D**). Surprisingly, CD73<sup>+</sup> Teff displayed increased capacity to produce

IFN- $\gamma$  in RA patients (**Fig. 4C**) and to co-produce IFN- $\gamma$  and IL-17A after MTX treatment in both RA (**Fig. 4C**) and PsA patients (**Fig. 4D**). Finally, we evaluated the presence of several pro-inflammatory cytokines in the plasma of untreated and MTX-treated patients (**Fig. 5**). We did not detect cytokines in the plasma of HD except for IL-21, present in 70% of them (data not shown). We could evidence that less cytokines were detectable in the plasma of MTX-treated patients compared to untreated ones both in RA and PsA. Moreover, the combinations of cytokines found in patients differed a lot between both pathologies, with a dominance of IL-6 in RA patients while a higher heterogeneity in PsA patients. IFN- $\gamma$  and IL-17A were mostly detected in plasma of untreated patients (4/13 in RA, 5/11 in PsA) and were often found in combination with other cytokines (4/4 in RA, 4/5 in PsA). The simultaneous detection of IL-17A, IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  was observed in plasma from untreated RA and PsA patients and in SF (data not shown, n=2).

## Discussion

In this study, we evidenced a dynamic expression of CD73 on Th populations in peripheral blood of RA and PsA patients influenced by MTX treatment. CD73 levels were found decreased on Th1, Th1.17, Th22 and to a lesser extent Th17 cells in untreated patients compared to HD. Restoration of CD73 levels on these cells upon MTX treatment could account for an indirect effect enhancing MTX anti-inflammatory functions.

Improving RA and PsA treatment with the development of new therapeutic approaches is an ongoing challenge that requires to decipher the pathologic modifications of immune cells at the roots of the establishment of the chronic inflammatory state that characterizes these pathologies.

The diverse pro-inflammatory Th populations appear as good targets to breakdown the chronic inflammation<sup>27</sup>. We focused our work on the poly-functional CD73<sup>+</sup> Teff population recently described in human as enriched in Th1.17 and Th17<sup>12</sup>. Since we previously showed that CD73 expression renders them selectively sensitive to the inhibition by CD39<sup>+</sup> Treg through autocrine Ado activity, we aimed at better understanding the dynamic of expression of CD73 on Th1.17 and Th17 that play a central role in RA and PsA<sup>3,4,28</sup>. FC analyses on PBMC from untreated RA and PsA patients didn't highlight any modification in Treg frequencies in agreement of previous data<sup>29</sup> although we noticed higher CD39 expression on these Treg in untreated RA but not in PsA patients in contrast to other RA studies<sup>3,29,30</sup>. CD73 expression significantly diminished on blood Teff in untreated RA and PsA patients compared to HD. And this decrease was even stronger in SFMC, indicating that blood CD73 levels might mirror the extent of the inflammation in the affected joints as previously suggested in juvenile idiopathic arthritis<sup>31</sup>. Dampened or inefficient Treg suppressive functions described by others in RA and PsA patients<sup>32</sup> could partly result from this decreased expression of CD73 on activated Teff, as

it may impair CD39<sup>+</sup> Treg and CD73<sup>+</sup> Teff cooperation for self-inhibition through autocrine Ado production. In line with this, CD73 expression level on synovial lymphocytes was proposed as a marker of disease activity in idiopathic juvenile arthritis<sup>31</sup> and could also be monitored in adults.

The decreased CD73 expression was especially noticed on Th1 and Th1.17 subsets compared to HD. Considering the strong plasticity of Th differentiation and recent data showing that Th1.17 can shift to unconventional Th1 cells when exposed to inflammatory cytokines<sup>3,33</sup>, we suggest this decreased CD73 expression monitored on Th1 might comprise activated non-classical Th1 cells phenotypically characterized by CXCR3 expression. We hypothesize that this loss of CD73 expression, might be required to escape Treg regulation and to mediate their deleterious contribution to the pathology. Although not reaching statistical significance, CD73 downregulation was also observed on Th17 cells that highly express. CD39, suggesting an activated state. The evaluation of proliferation state (Ki67 staining, cell cycle analysis) of each subset will help to better understand if this CD73 loss rely on proliferation of specific subsets, key actors in these pathologies.

Considering the poly-functionality of Teff in untreated patients, we did not notice significant variations compared to HD in contrast to other studies reporting higher frequency of IL-17A producing cells in peripheral blood of PsA patients<sup>34,35</sup>. Discrepancies raised might come from the difference in activator strengths used to assess IL-17A production but also from patients' medical history and sampling criteria. These results still remain to be confirmed on a bigger cohort of untreated RA and PsA patients. It would also be interesting to confirm that Teff from untreated patients display low or no alteration of their cytokine production in presence of exogenous AMP because of their low expression of CD73 contrary to HD<sup>12</sup>. In addition, we evidenced that the frequency of IL-22 producing cells is slightly higher in untreated PsA patients compared to HD and to untreated RA patients. This is in line with the high IL-22 production by Teff previously reported in blood of PsA patients. Of interest, CD73<sup>+</sup> Teff account for a non-negligible source of IL-22, which play a central role in PsA<sup>36</sup>. We could not evaluate precisely CD73 on Th22 cells using specific phenotypic markers, since they are lacking so far, but we confirmed that single IL-22-producing cells were enriched among CD73<sup>+</sup> Teff compared to CD73<sup>neg</sup> counterparts. Because of its dual role in inflammation, there is however no clear consensus as to whether IL-22 is deleterious in PsA. On the one hand, IL-22 has been reported to impair terminal keratinocytes differentiation in Pso, contributing to the pathogenesis of the disease<sup>37</sup>. On the other hand, a recent study suggests a regulatory role of IL-22 in PsA patients since IL-22<sup>+</sup> cells frequency is decreased in these patients compared to HD<sup>38</sup>. In this paper however, treated and untreated patients have been pooled together and compared to HD, making the interpretation more difficult. IL-22 undoubtedly plays a central role in PsA but discriminating its role in Pso from PsA lesions may require a read out more

precise than monitoring of IL-22 production by peripheral Teff. In RA, inflammation in the SF seems mediated by IL-17A independently of IL-22 signaling<sup>39</sup>. Nevertheless, IL-22 can be found in high concentrations in RA patients due to its production by Th17 and Th1.17 cells that are subsets highly activated in the pathology.

In our study, MTX treatment of RA and PsA patients did not induce changes on Treg frequency and CD39 expression intensity. This contrasts with previous reports indicating the increased CD39<sup>+</sup> Treg frequencies in MTX responders<sup>40</sup>. In this study however, authors suggest the direct production of Ado by Treg expressing both CD39 and CD73 which is in contradiction with observations we and others made<sup>12,41</sup>. Its activity indeed favors increased concentration of extracellular AMP which can in turn be degraded by CD73 expressed by surrounding Teff. High CD39<sup>+</sup> Treg frequency at baseline could however correlate with good MTX response and CD39 is therefore suggested as a biomarker of MTX response in RA<sup>40,42</sup>. Our analysis of untreated and MTX-treated paired samples of RA and PsA patients demonstrated a CD73 frequency, induced by MTX, among Th1.17, Th1 and most certainly Th17, closer to HD. This could result from an arrest in cell proliferation induced by A2AR engagement by Ado release resulting from MTX-induced AICAR blockade<sup>15</sup>. We hypothesize that restoration of CD73 expression, through degradation of AMP, in turn accentuate the Ado-mediated immunosuppression initiated by MTX. The loss of CD73 expression on Teff could indeed be necessary for their proliferation and pro-inflammatory features to escape CD39<sup>+</sup> Treg mediated suppression through cooperative Ado production. Ado produced by CD73<sup>+</sup> Teff may also help the expansion of Treg<sup>19</sup> and Breg<sup>43</sup> that will participate in the alleviation of disease severity.

In MTX-treated PsA patients, up-regulation of CD73 on Teff appears however less important than in RA patients. This could rely on the fact that PsA is a joint affection mostly developing subsequently to established Pso that is more heterogeneous in its characterization and symptoms. The immune-biological regulation of PsA inflammation is therefore different from RA and joint affection in PsA might be fueled by specific immune cells active in Pso and possibly interfering with MTX effect. Indeed, auto-reactive CD8<sup>+</sup> T cells have been shown to contribute to Pso and should be considered. Th22 that produce high levels of IL-22 and are enriched in Pso lesions are also suspected to play a deleterious role.

We also showed an enhanced cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-17A/IFN- $\gamma$ , IL-22) production capacity of CD73<sup>+</sup> Teff in RA patients after MTX treatment. We can however expect these cells to be less pro-inflammatory *in vivo* since they express higher level of CD73 favoring Ado production. We and others indeed previously showed that Ado strongly reduced CD73<sup>+</sup> Teff cytokine pattern except IL-17A and, to a lesser extent, IL-22<sup>12,30</sup>. These data suggest a benefit of concomitant MTX treatment which may have synergistic effect with anti-IL-17A in contrast to TNF inhibitors in PsA<sup>44</sup>. Similarly in RA, although MTX and anti-IL-6R such as Tocilizumab combination has not shown clinically relevant short-term superiority over Tocilizumab

monotherapy<sup>45</sup>, concomitant MTX treatment with Tocilizumab may have an interest in low Tocilizumab responders. We indeed evidenced down-regulation of both IL-6R and gp130 on CD73<sup>+</sup> Teff compared to CD73<sup>neg</sup> Teff (unpublished results) suggesting a reduced impact of anti-IL-6R on CD73<sup>+</sup> Teff. MTX could therefore better neutralize activated and proliferating CD73<sup>+</sup> Teff while anti-IL-6R might target CD73<sup>neg</sup> Teff, their combined action providing a better regulation of the whole Teff population.

Purine metabolism and its regulation raises increasing interest to improve our comprehensive understanding of the immuno-biological mechanisms at the roots of these pathologies and combining therapy strategies to reach the best response rate for patients will require further investigation.

### **Acknowledgments**

We wish to thank the staff of the Rheumatology department at the Hôpital Lyon-Sud for providing patients samples.

### **Competing interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Fundings**

This work was financially supported by the SIRIC project (LyriCAN, grant no. INCa-DGOS-Inserm\_12563).

### **Key messages:**

Treg are inefficient to suppress Teff in chronic rheumatic diseases and pro-inflammatory Th cells, notably Th17 and Th1.17 can proliferate and produce high amounts of pro-inflammatory cytokines.

CD73, responsible for production of extracellular immunosuppressive Ado is less expressed in untreated RA and PsA patients compared to HD.

MTX treatment of RA and PsA patients partially restores CD73 expression on Th cells enabling a better control of their inflammatory potential.

MTX contributes to the restoration of Treg-mediated immune regulation of Teff through restoration of CD73 expression by highly pro-inflammatory Teff

CD73 might be a good marker to evaluate MTX response in RA and PsA patients.

### **References**



1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356–361. doi:10.1038/nature01661
2. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005;64 Suppl 2:ii14–17. doi:10.1136/ard.2004.032482
3. Basdeo SA, Cluxton D, Sulaimani J, Moran B, Canavan M, Orr C, Veale DJ, Fearon U, Fletcher JM. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2017;198(6):2249–2259. doi:10.4049/jimmunol.1600737
4. Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, Jager W de, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M, Wedderburn LR. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(33):14751–14756. doi:10.1073/pnas.1003852107
5. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Genovese MC. IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;359(1–2):419–429. doi:10.1007/s11010-011-1036-6
6. Burman A, Haworth O, Bradfield P, Parsonage G, Filer A, Thomas AMC, Amft N, Salmon M, Buckley CD. The role of leukocyte-stromal interactions in chronic inflammatory joint disease. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*. 2005;72(1):10–16. doi:10.1016/j.jbspin.2004.03.009
7. Hot A, Zrioual S, Lenief V, Miossec P. IL-17 and tumour necrosis factor  $\alpha$  combination induces a HIF-1 $\alpha$ -dependent invasive phenotype in synoviocytes. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2012;71(8):1393–1401. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200867
8. Raychaudhuri SK, Saxena A, Raychaudhuri SP. Role of IL-17 in the pathogenesis of psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis. *Clinical Rheumatology*. 2015;34(6):1019–1023. doi:10.1007/s10067-015-2961-7
9. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AMC, Colin EM, Hazes JMW, Dolhain RJEM, Lubberts E. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis and Rheumatism*. 2011;63(1):73–83. doi:10.1002/art.30093
10. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(9):1345–1352. doi:10.1172/JCI5703
11. Ménétrier-Caux C, Curiel T, Faget J, Manuel M, Caux C, Zou W. Targeting regulatory T cells. *Targeted Oncology*. 2012;7(1):15–28. doi:10.1007/s11523-012-0208-y
12. Gourdin N, Bossennec M, Rodriguez C, Vigano S, Machon C, Jandus C, Bauché D, Faget J, Durand I, Chopin N, et al. Autocrine Adenosine regulates tumor polyfunctional CD73+CD4+ effector T cells devoid of immune checkpoints. *Cancer Research*. 2018 Mar 20. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2405
13. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(12):731–742. doi:10.1038/nrrheum.2016.175

14. Chan ESL, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(3):175–178. doi:10.1038/nrrheum.2010.5
15. Cronstein BN. Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Pharmacological Reviews*. 2005;57(2):163–172. doi:10.1124/pr.57.2.3
16. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernández P, Cronstein BN. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis and Rheumatism*. 2007;56(5):1440–1445. doi:10.1002/art.22643
17. Mirabet M, Herrera C, Cordero OJ, Mallol J, Lluís C, Franco R. Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *Journal of Cell Science*. 1999;112(4):491–502.
18. Zarek PE, Huang C-T, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 2008;111(1):251–259. doi:10.1182/blood-2007-03-081646
19. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Frontiers in Immunology*. 2012 [accessed 2018 Apr 30];3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3389649/>. doi:10.3389/fimmu.2012.00190
20. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69(9):1580–1588. doi:10.1136/ard.2010.138461
21. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis and Rheumatism*. 2006;54(8):2665–2673. doi:10.1002/art.21972
22. Todd Derrick J., Knowlton Nicholas, Amato Michael, Frank Mark Barton, Schur Peter H., Izmailova Elena S., Roubenoff Ronenn, Shadick Nancy A., Weinblatt Michael E., Centola Michael, et al. Erroneous augmentation of multiplex assay measurements in patients with rheumatoid arthritis due to heterophilic binding by serum rheumatoid factor. *Arthritis & Rheumatism*. 2011;63(4):894–903. doi:10.1002/art.30213
23. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):2076–2082. doi:10.1002/eji.200939722
24. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, Evans J, Eddaoudi A, Eaton S, Wedderburn LR. 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. *The Journal of Immunology*. 2010;185(1):134–143. doi:10.4049/jimmunol.0803474
25. Zhou Q, Yan J, Putheti P, Wu Y, Sun X, Toxavidis V, Tigges J, Kassam N, Enjyoji K, Robson SC, et al. Isolated CD39 Expression on CD4+ T Cells Denotes both Regulatory and Memory Populations. *American journal of*

transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2009;9(10):2303–2311. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02777.x

26. Chrobak P, Charlebois R, Rejtar P, Bikai RE, Allard B, Stagg J. CD73 Plays a Protective Role in Collagen-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology*. 2015;194(6):2487–2492. doi:10.4049/jimmunol.1401416

27. Sarkar S, Cooney LA, Fox DA. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010;159(3):225–237. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04016.x

28. Kotake S, Yago T, Kobashigawa T, Nanke Y. The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Medicine*. 2017 [accessed 2018 Mar 27];6(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5532575/>. doi:10.3390/jcm6070067

29. Walter GJ, Fleskens V, Frederiksen KS, Rajasekhar M, Menon B, Gerwien JG, Evans HG, Taams LS. Phenotypic, Functional, and Gene Expression Profiling of Peripheral CD45RA+ and CD45RO+ CD4+CD25+CD127low Treg Cells in Patients With Chronic Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.j.)*. 2016;68(1):103–116. doi:10.1002/art.39408

30. Herrath J, Chemin K, Albrecht I, Catrina AI, Malmström V. Surface expression of CD39 identifies an enriched Treg-cell subset in the rheumatic joint, which does not suppress IL-17A secretion. *European Journal of Immunology*. 2014;44(10):2979–2989. doi:10.1002/eji.201344140

31. Botta Gordon-Smith S, Ursu S, Eaton S, Moncrieffe H, Wedderburn LR. Correlation of Low CD73 Expression on Synovial Lymphocytes With Reduced Adenosine Generation and Higher Disease Severity in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.j.)*. 2015;67(2):545–554. doi:10.1002/art.38959

32. Prakken B, Wehrens E, Wijk F van. Editorial: Quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(3):552–554. doi:10.1002/art.37831

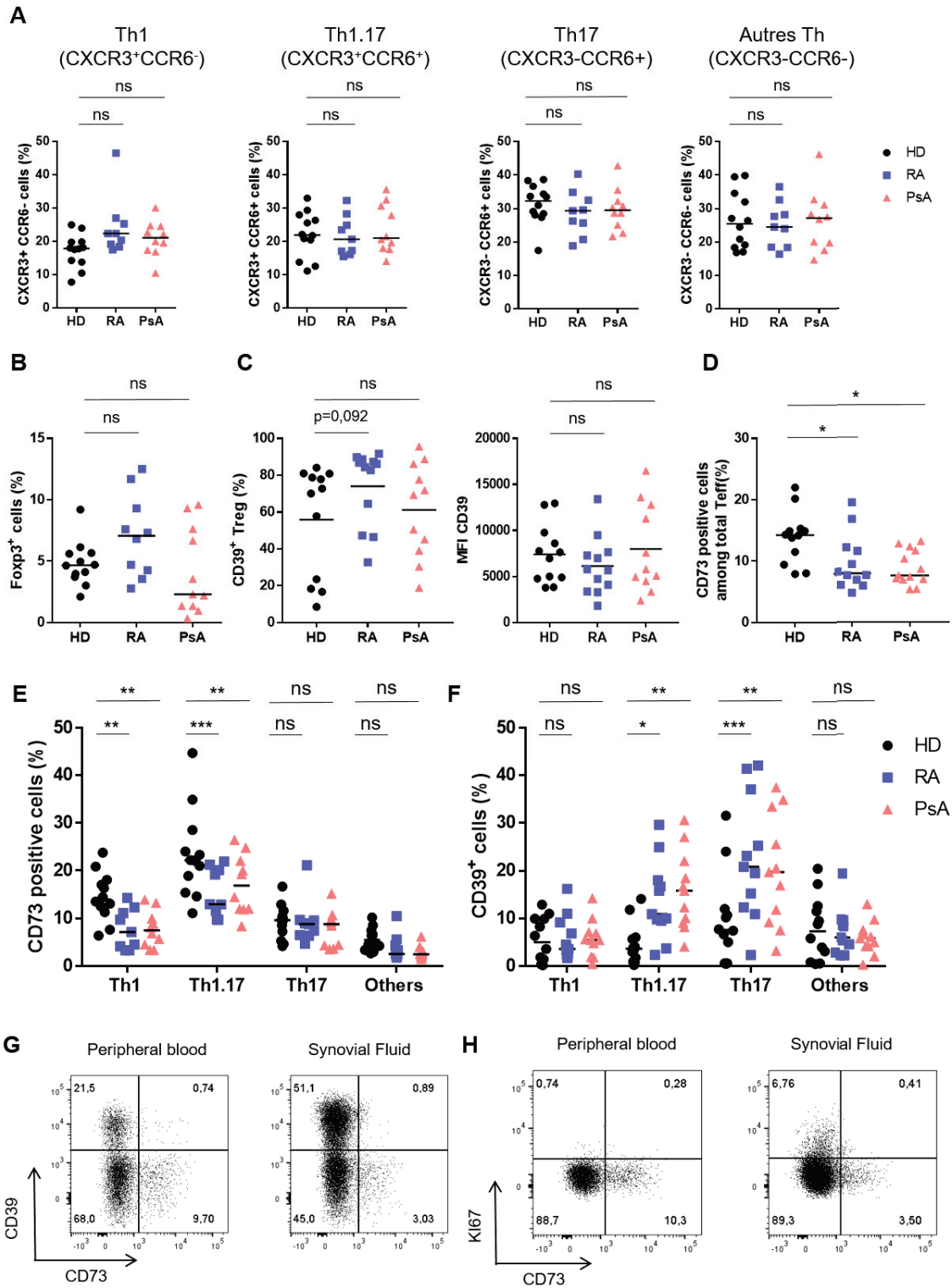
33. Maggi Laura, Santarlaschi Veronica, Capone Manuela, Rossi Maria Caterina, Querci Valentina, Mazzoni Alessio, Cimaz Rolando, De Palma Raffaele, Liotta Francesco, Maggi Enrico, et al. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *European Journal of Immunology*. 2012;42(12):3180–3188. doi:10.1002/eji.201242648

34. Jandus C, Bioley G, Rivals J-P, Dudler J, Speiser D, Romero P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(8):2307–2317. doi:10.1002/art.23655

35. Zhang L, Li Y, Li Y, Qi L, Liu X, Yuan C, Hu N, Ma D, Li Z, Yang Q, et al. Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE*. 2012 [accessed 2018 May 21];7(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317658/>. doi:10.1371/journal.pone.0031000

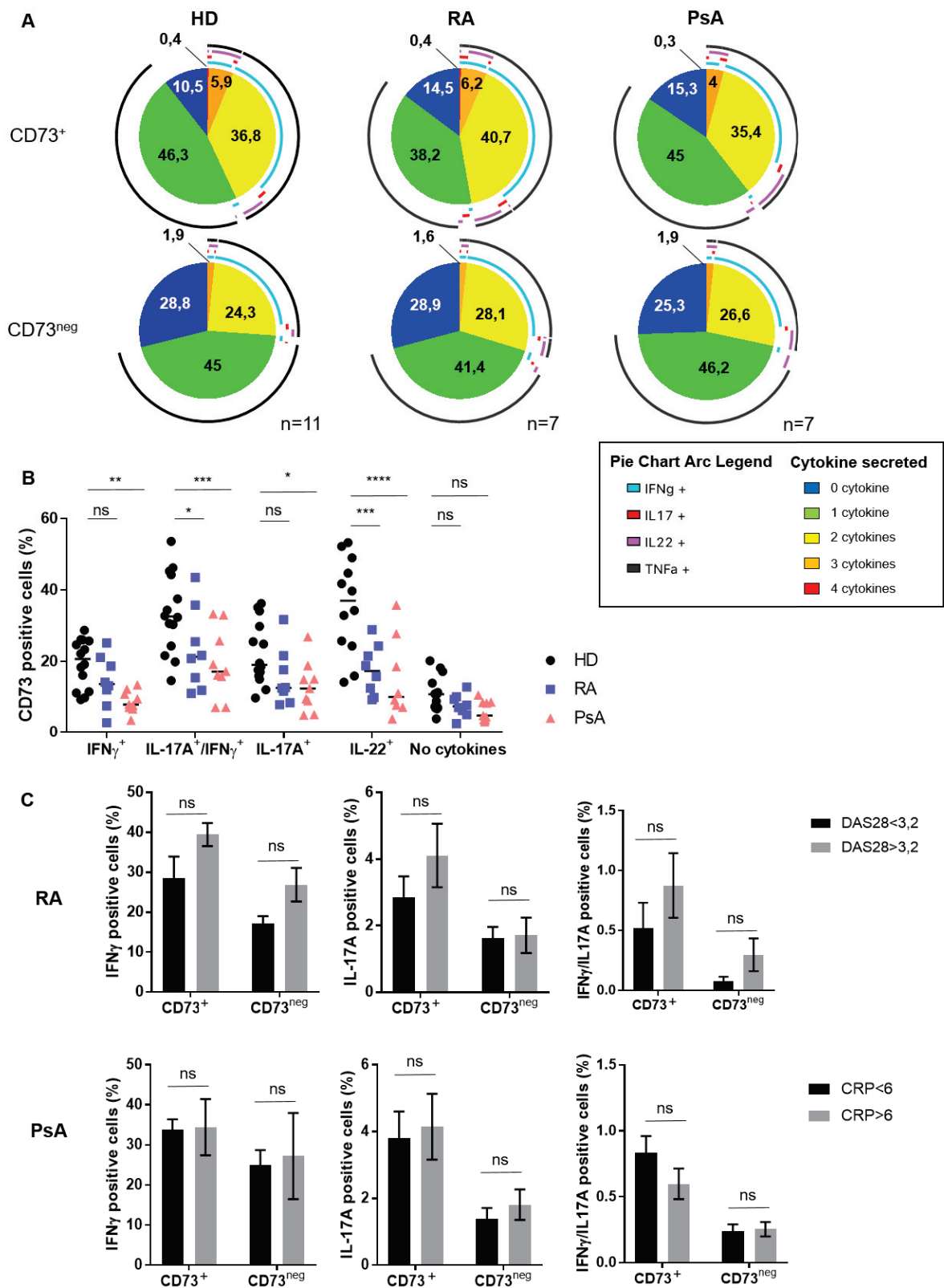
36. Benham H, Norris P, Goodall J, Wechalekar MD, FitzGerald O, Szentpetery A, Smith M, Thomas R, Gaston H. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Research & Therapy*. 2013;15(5):R136. doi:10.1186/ar4317

37. Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, Kunz S, Döcke W-D, Asadullah K, Volk H-D, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *European Journal of Immunology*. 2009;39(12):3570–3581. doi:10.1002/eji.200939687
38. Ezeonyeji A, Baldwin H, Vukmanovic-Stejic M, Ehrenstein MR. CD4 T-Cell Dysregulation in Psoriatic Arthritis Reveals a Regulatory Role for IL-22. *Frontiers in Immunology*. 2017 [accessed 2018 May 17];8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666299/>. doi:10.3389/fimmu.2017.01403
39. Hamburg JP van, Corneth OBJ, Paulissen SMJ, Davelaar N, Asmawidjaja PS, Mus AMC, Lubberts E. IL-17/Th17 mediated synovial inflammation is IL-22 independent. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013;72(10):1700–1707. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202373
40. Peres RS, Liew FY, Talbot J, Carregaro V, Oliveira RD, Almeida SL, França RFO, Donate PB, Pinto LG, Ferreira FIS, et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(8):2509–2514. doi:10.1073/pnas.1424792112
41. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, Winterhalter A, Doherty G, Deaglio S, Koulmanda M, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(11):2410–2420. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03291.x
42. Gupta V, Katiyar S, Singh A, Misra R, Aggarwal A. CD39 positive regulatory T cell frequency as a biomarker of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2018;21(8):1548–1556. doi:10.1111/1756-185X.13333
43. Figueiró F, Muller L, Funk S, Jackson EK, Battastini AMO, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of CD39<sup>high</sup> human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology*. 2016 [accessed 2018 Mar 20];5(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4801473/>. doi:10.1080/2162402X.2015.1082703
44. Fagerli KM, Lie E, van der Heijde D, Heiberg MS, Lexberg AS, Rødevand E, Kalstad S, Mikkelsen K, Kvien TK. The role of methotrexate co-medication in TNF-inhibitor treatment in patients with psoriatic arthritis: results from 440 patients included in the NOR-DMARD study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014;73(1):132–137. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202347
45. Dougados M, Soubrier M, Antunez A, Balint P, Balsa A, Buch M, Casado G, Detert J, El-zorkany B, Emery P, et al. Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013 Oct 1:annrheumdis-2013-204223. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204223



**Figure 1: In untreated RA and PsA patients' blood Th populations frequencies are not modulated but CD73 expression is decreased within Th1.17 and Th1 compared to HD. A.** Th subsets frequencies based on phenotypic analysis (CXCR3/CCR6 staining). **B.** Frequencies of FoxP3<sup>+</sup> Tregs. **C.** Frequencies (left) and MFI (right) of CD39<sup>+</sup> Tregs. **D.** CD73 expression on total Teff. **E.** CD73 expression by Th subsets. **F.** CD39

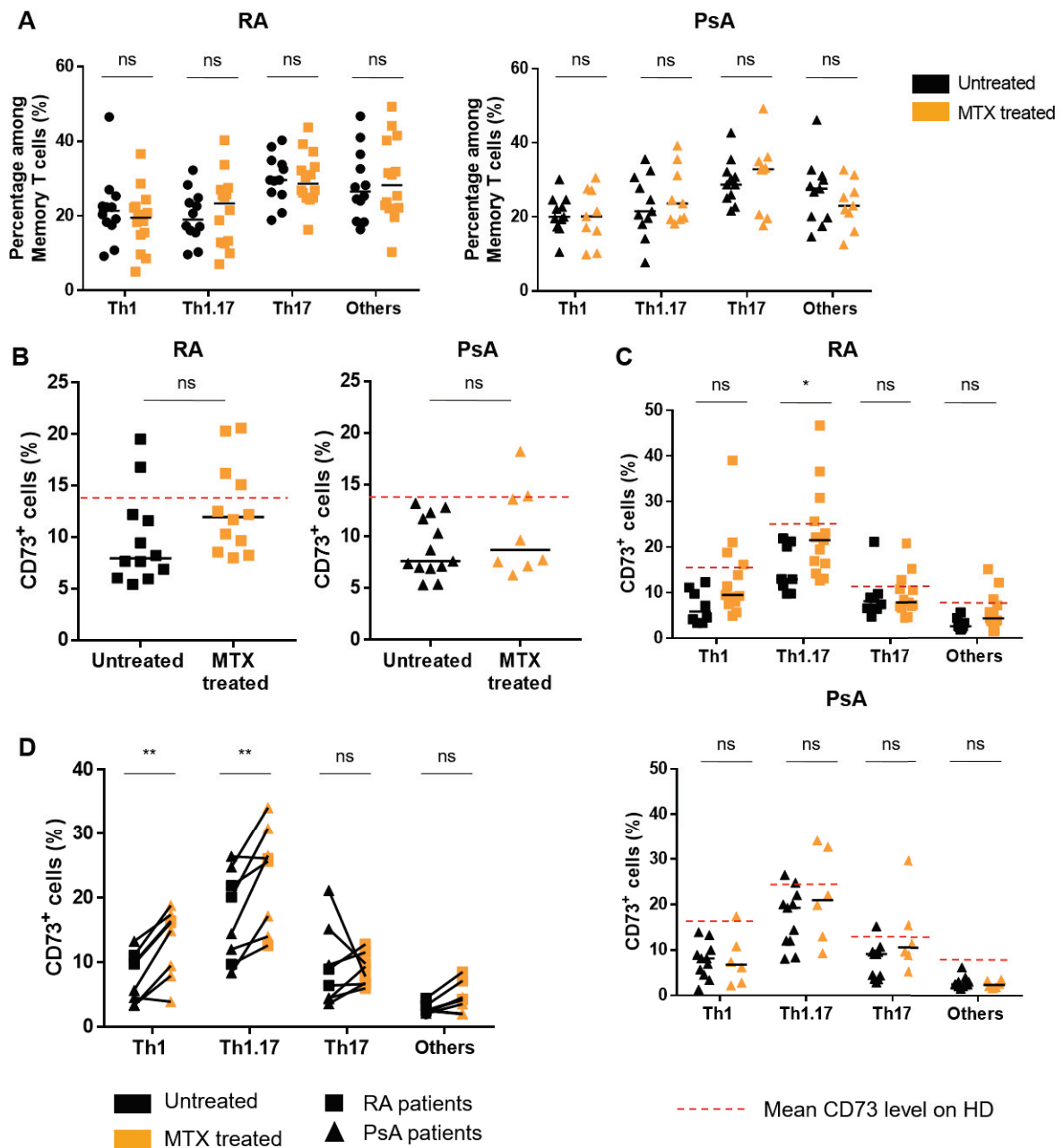
expression by Th subsets. (from A to F: analyses performed on peripheral blood. **G.** and **H.** Facs plots on total Teff in peripheral blood and synovial fluid of an untreated RA patient showing CD73/CD39 and CD73/Ki67 staining respectively. A-D: Kruskal-Wallis test, E-F: ANOVA-2. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*:  $p < 0,0001$ .



**Figure 2: Polyfunctionality of Teff is not altered in RA and PsA patients but there are less CD73<sup>+</sup> identified in IL-17A/IFN- $\gamma$  secreting Teffs. A. SPICE® representation of the cytokines secreted by either CD73<sup>+</sup> or CD73<sup>neg</sup> Teffs from peripheral blood of HD, or**

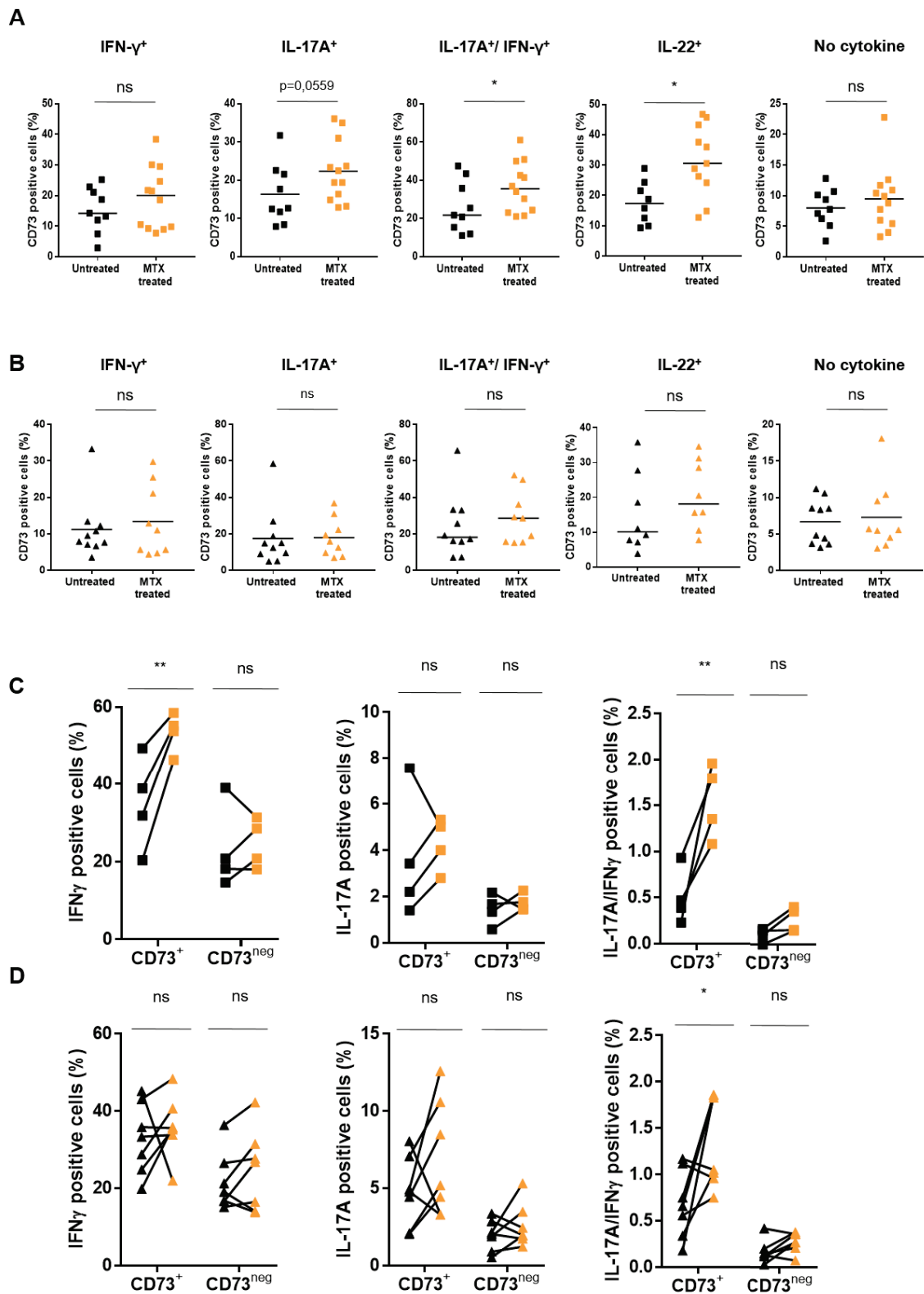
untreated RA and PsA patients. **B.** CD73 expression on Teffs according to their secretion of IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-22 in peripheral blood of HD or untreated RA and PsA patients. **C.** IFN- $\gamma$  and IL-17A mono or co-production by Teff according to their CD73 expression in untreated RA and PsA patients respectively stratified on DAS28-CRP score and CRP seric level. B-C: ANOVA-2. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .





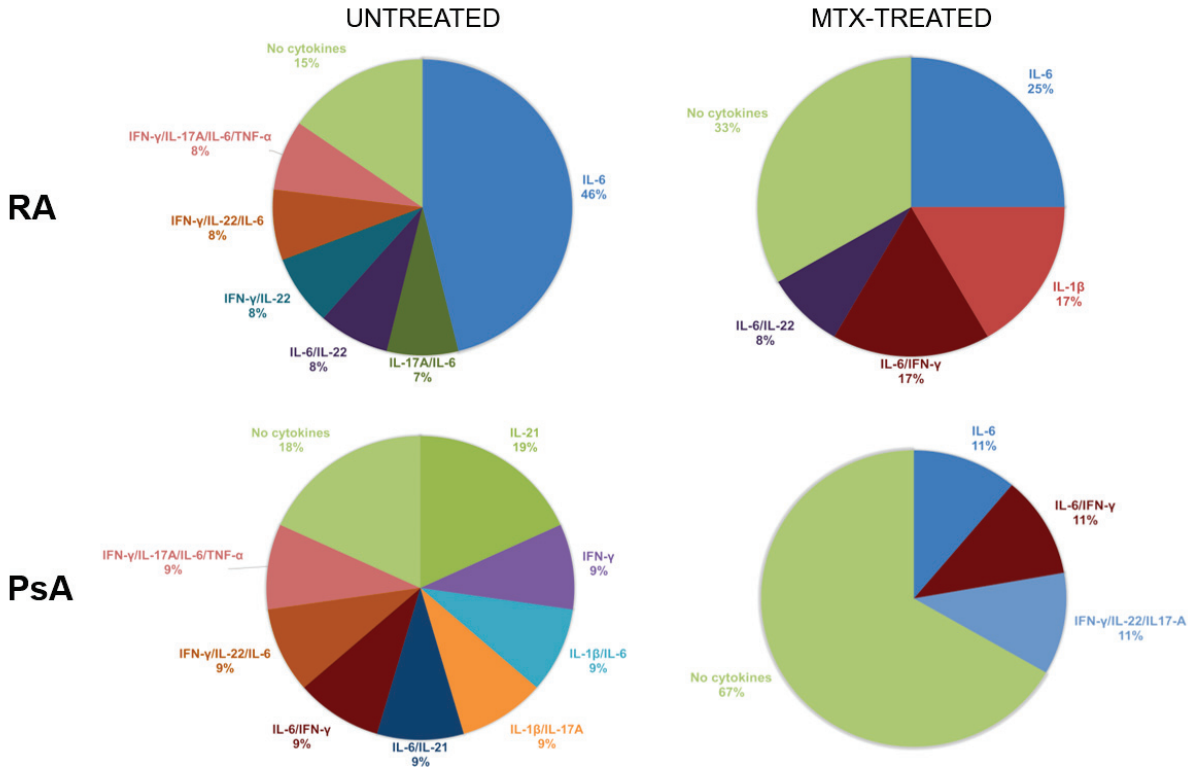
**Figure 3: MTX treatment restores CD73 levels on Teff populations in RA patients but not in PsOA patients.** **A.** Frequencies of Th subsets in peripheral blood of untreated vs MTX-treated RA (left) and PsA (right) patients. **B.** CD73 percentages on total Teffs in peripheral blood of untreated vs MTX treated RA (left) and PsOA (right) patients. **C.** CD73 percentages on Th subsets of untreated vs MTX-treated RA (up) and PsOA (down) patients. **D.** Paired samples showing CD73 percentages modulation in Th subsets upon MTX treatment in RA and PsA patients. A-C: ANOVA-2, B: Mann-Whitney test, D: ANOVA-2 with paired values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .





**Figure 4: Impact of MTX treatment on Teff polyfunctionality. A-B.** Analysis of CD73 expression on cytokine secreting Teff mirrors phenotypic analysis in RA (A) and PsA (B) patients. **C-D.** IFN- $\gamma$ , IL-17A producing and IFN- $\gamma$ /IL-17A co-producers in RA (C) and PsA

(D) patients before initiation of MTX treatment and under MTX treatment. A-B: Mann-Whitney tests, C-D: ANOVA-2 paired samples \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$ .



**Figure 5: Analysis of cytokine content in patients’ plasmas reveals various profiles that tend to be limited with MTX treatment.** Cytokine quantification in plasmas of untreated vs MTX treated RA and PsA patients.

## Supplementary material and figures

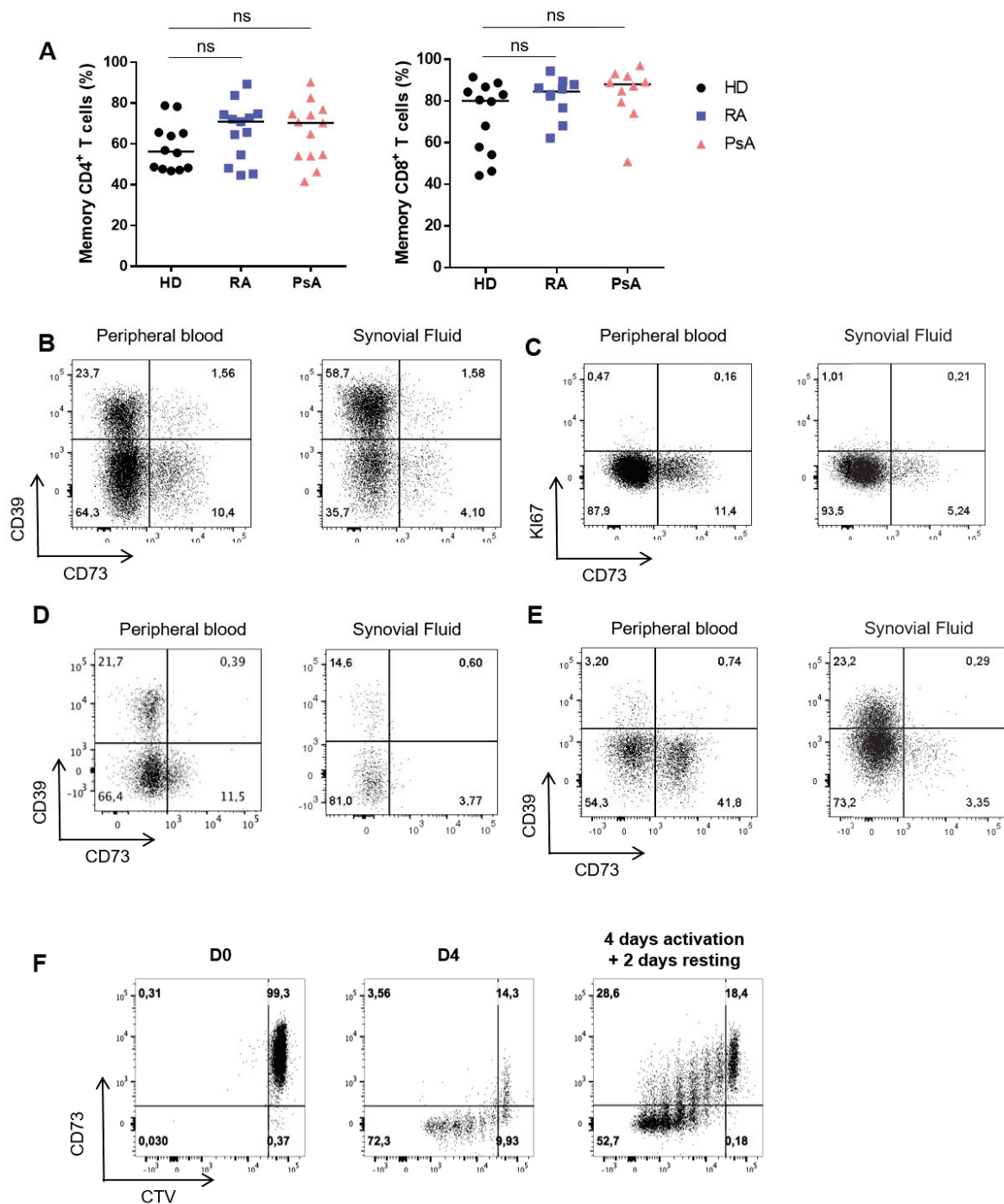
### Supplementary information relative to Supplementary Figure 1

#### *CD73<sup>+</sup> Teff sorting and in vitro activation to assess CD73 dynamic expression*

Memory CD4<sup>+</sup> T cells were purified from HD PBMCs using MagniSort™ Human CD4<sup>+</sup> Memory T Cell Enrichment Kit (Invitrogen). CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Teff (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> CD39<sup>neg</sup>CD73<sup>+</sup>) and CD73<sup>neg</sup>CD4<sup>+</sup> Teff (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>CD39<sup>neg</sup>CD73<sup>neg</sup>) were sorted from purified memory CD4<sup>+</sup> T cells by multi-parametric FC (FACS Aria III, BD Biosciences) using antibodies against CD25 (2A3, BD-Biosciences), CD45RA (2H4LDH11LDB9, Beckman-Coulter), as well as CD127 (eBioRDR5), CD39 (eBioA1) and CD73 (AD2) (all from eBioscience), alongside a viability marker (DAPI).

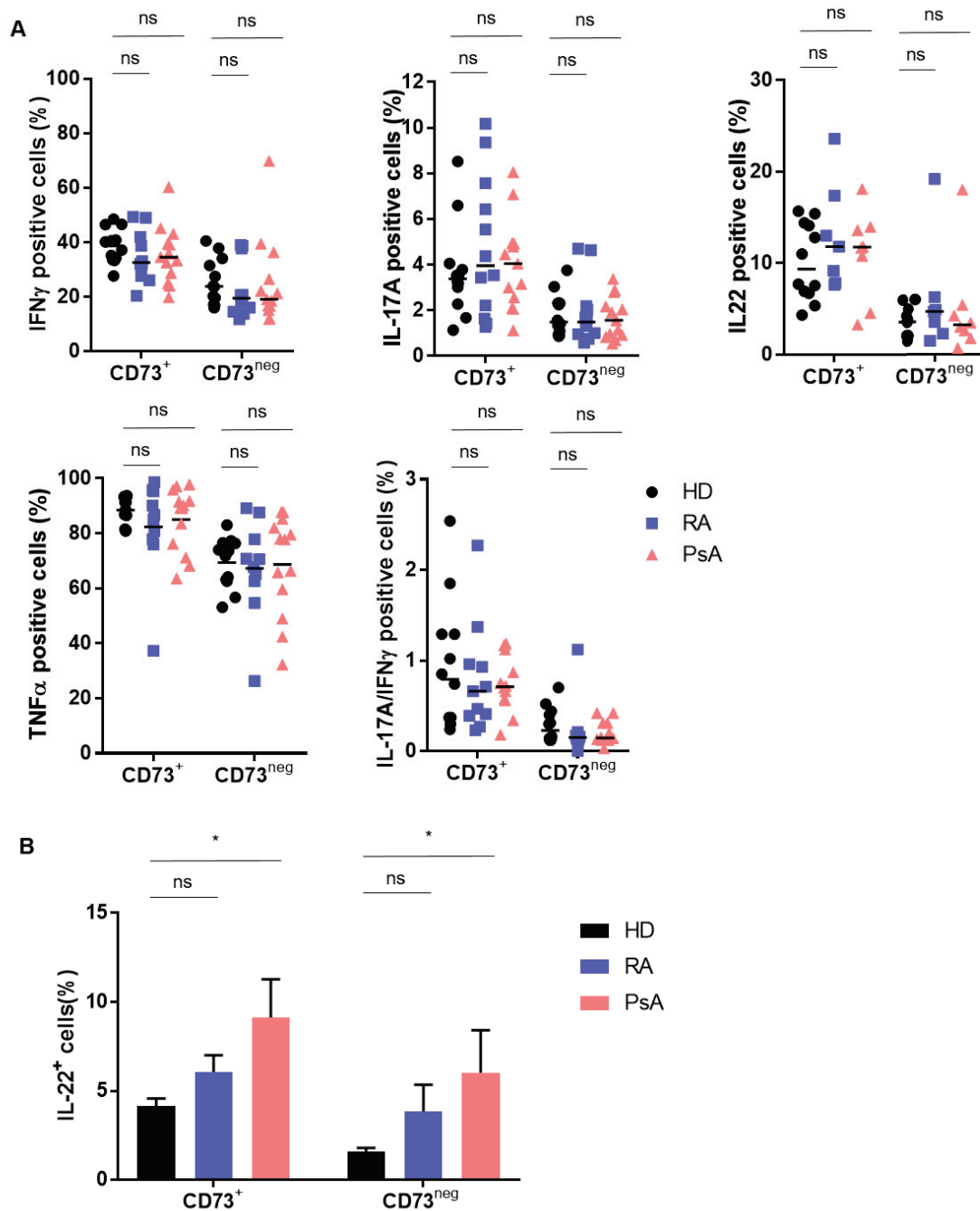
Sorted populations were stained with CellTrace Violet (CTV) (20 μM, LifeTechnologies) proliferation markers before incubation with Expand beads (Gibco) (ratio 1:4) in 96-round-bottomed-well plates in 200 μl of complete RPMI medium for 4 days at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

After 4 days' proliferation, part of the cells was stained for viability and CD73 expression with anti-human anti-CD73 and cells were fixed with 2% Formaldehyde solution (Sigma) and stored at 4°C. The rest of the cells were washed and removed from Expand beads using a magnet. They were then re-incubated in 200 μl of complete RPMI medium + 50UI IL-2 (Chiron) for a 2 days resting period at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. After resting, cells were stained for viability and CD73 expression as well. All time points were analyzed concomitantly by FC for viability, proliferation and CD73 expression (LSR Fortessa, BD Biosciences).

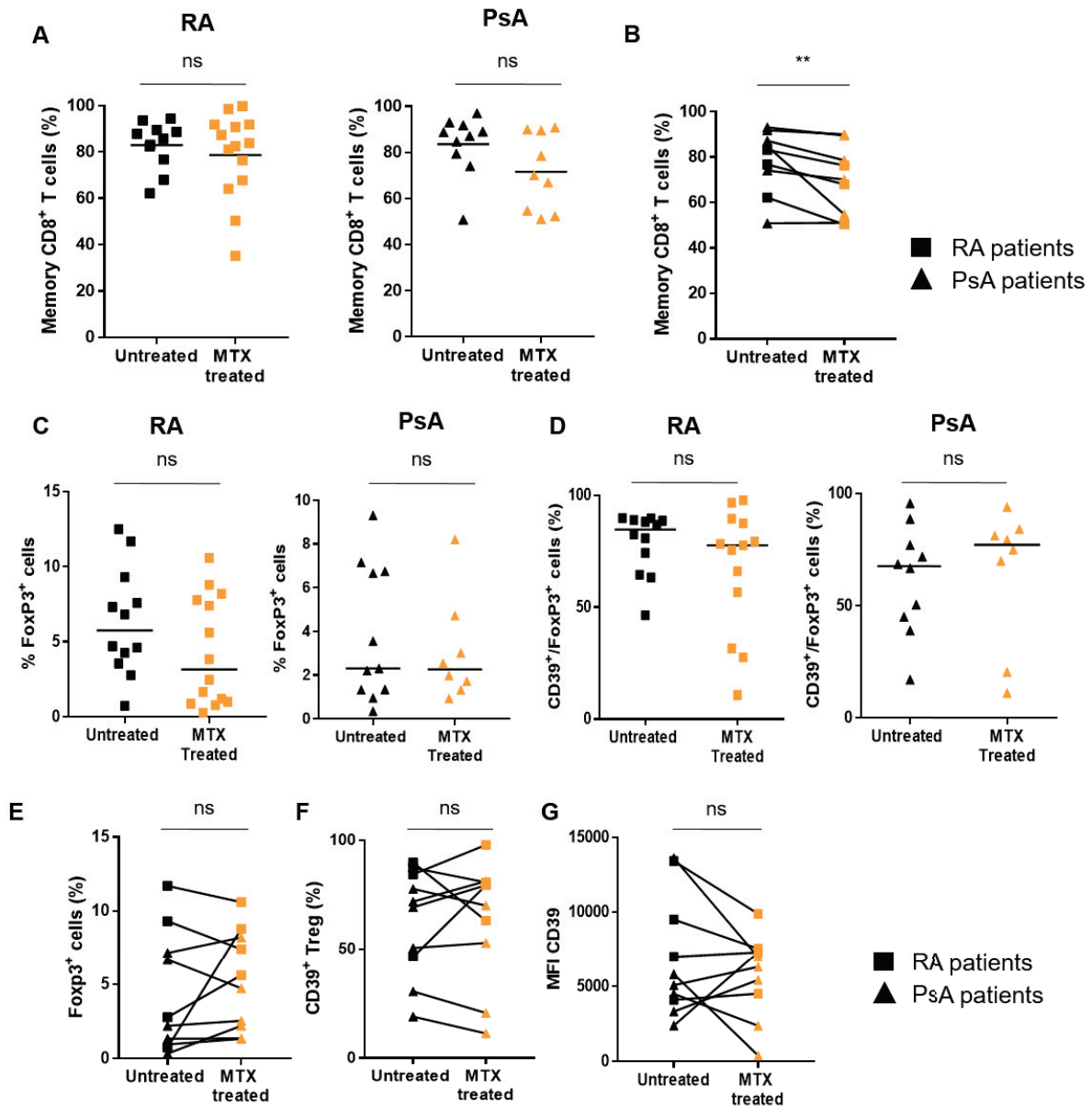


**Supp Figure 1: The overall frequencies of memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are not altered in patients' blood, however the frequency of memory CD73<sup>+</sup> T cells is decreased in both compartments reflecting their high level of activation. A.** Memory CD4<sup>+</sup> (left) and memory CD8<sup>+</sup> (right) frequencies in HD, untreated RA and PsA patients peripheral blood. **B-C.** CD73/CD39 (**B**) CD73/Ki67 (**C**) staining on total Teff in peripheral blood and synovial fluid of a PsA patient before initiation of treatment. **D.** CD73/CD39 staining on Th1.17 cells in peripheral blood of a PsA patient before initiation of treatment. **E.** FACS plot of CD73/CD39 staining on total CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood and

synovial fluid of a RA patient before initiation of treatment. **F.** CD73 dynamic of expression assessed by FC on sorted CD73<sup>+</sup> blood Teff stimulated in vitro with anti-CD3/anti-CD28 coated beads for 96h. A-B: Kruskal-Wallis test.

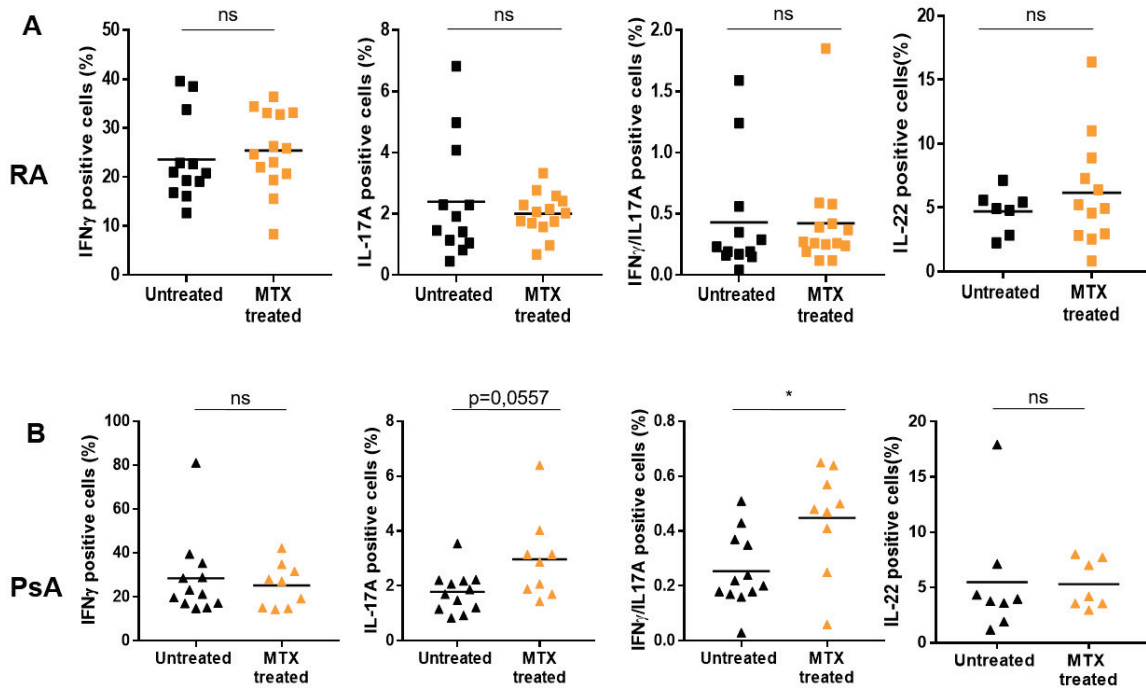


**Supp. Figure 2: Teff from RA and PsA patients evidence the same capacities for cytokine secretion but an increase in Th22 cells is observed in peripheral blood of PsA patients. A.** Monitoring of IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-22, TNF- $\alpha$  producing and IFN- $\gamma$ /IL-17A co-producing Teff stratified on their CD73 expression. **B.** Analysis of single IL-22 producing Teff in HD and untreated RA and PsA patients. A-B: ANOVA-2. \*: p<0,05.



**Supp Figure 3: MTX treatment induces a slight decrease of memory CD8<sup>+</sup> T cells frequency in PsA patients and does not modify Treg proportion and activation status in RA and PsA patients.** **A.** Memory CD8<sup>+</sup> T cells frequencies in untreated vs MTX-treated RA (left) and PsA (right) patients. **B.** Paired samples showing CD8<sup>+</sup> T cells frequencies in untreated vs MTX-treated RA and PsA patients. **C.** Frequencies of FoxP3<sup>+</sup> Treg in untreated vs MTX-treated RA (left) and PsA (right) patients. **D.** Frequencies of CD39<sup>+</sup> cells among Treg in untreated vs MTX-treated RA (left) and PsA (right) patients. Frequencies of **E.** FoxP3<sup>+</sup> cells **F.** CD39<sup>+</sup> Treg and **G.** MFI of CD39 on Treg in paired samples of untreated vs MTX-treated RA and PsA patients. A, C and D: Mann-Whitney test, B-E : Wilcoxon test. \*p<0.05, \*\*p<0.001





**Supp Fig 4: Moderate increase of IL-17A secretion by Teff in PsA but not in RA patients under MTX treatment.** Analysis of IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-22 producing and IFN- $\gamma$ /IL-17A co-producing Teff in RA (**A**) and PsA (**B**) patients before treatment initiation and under MTX treatment. \* $p < 0.05$ , assessed by Mann-Whitney test.

### III. LA POPULATION DE TEFF CD73<sup>+</sup> PRESENTE UNE CAPACITE ACCRUE DE RESISTANCE AUX CHIMIOTHERAPIES SUBSTRATS DE MDR1

Bossennec M., Di Roio A., Rodriguez C., Gourdin N., Hubert M., Durand I., Battiston-Montagne P., Caux C. <sup>✉</sup> and Ménétrier-Caux C. <sup>✉</sup> (✉ : Co-last authorship)

“MDR1 and CD73 co-expression identifies a Th1.17 effector population resistant to chemotherapy treatment that could play a pivotal role in anti-cancer immunity.”

La co-expression de MDR1 et de CD73 identifie une population Th1.17 effectrice qui résiste aux traitements de chimiothérapie et pourrait jouer un rôle central dans l’immunité anti-tumorale.

#### Résumé

Le transporteur Multi-Drug Resistance 1 (MDR1), codé par le gène *ABCB1* et un transporteur ABC capable d’exclure un grand nombre de xénobiotiques et de drogues anti-cancéreuses des cellules *via* un processus ATP-dépendant. MDR1 a été identifié dans plusieurs types tumoraux comme facteur de résistance aux chimiothérapies en limitant l’accumulation intracellulaire de drogues. Le paclitaxel et la doxorubicine, utilisés notamment dans le traitement du cancer du sein et de l’ovaire, sont deux substrats reconnus de MDR1. Egalement décrit sur les lymphocytes T, MDR1 est largement exprimé sur toutes les sous-populations de LTCD8 tandis qu’il est plus discrètement exprimé sur les LTCD4. Il est faiblement exprimé par les LT CD4 naïfs mais a en revanche été récemment associé aux Th1.17 parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires effecteurs (Teff). Notre équipe a démontré que les Teffs exprimant CD73 sont particulièrement enrichis en Th1.17 et une analyse transcriptomique a caractérisé *ABCB1* comme l’un des gènes les plus fortement exprimé par les Teffs CD73<sup>+</sup> par rapport aux Teffs CD73<sup>neg</sup>. L’ecto-nucléotidase CD73 permet la dégradation d’AMP extracellulaire en adénosine (Ado) immunosuppressive. Dans le microenvironnement tumoral, l’AMP extracellulaire peut être fourni par les Treg qui expriment fortement CD39 mais sont dépourvus du transporteur MDR1. Notre étude montre que les expressions de CD73 et MDR1 sont corrélées sur les Teff CD4<sup>+</sup>. MDR1 est parfaitement fonctionnel et, contrairement à CD73, est conservé au niveau protéique sur des Teff en prolifération. Ce travail démontre que les Teff CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> définissent plus précisément la population IL-17A<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. De manière générale, les Teff MDR1<sup>+</sup> sont également plus polyfonctionnels que les MDR1<sup>neg</sup>. Lorsqu’ils sont traités *in vitro* avec des doses croissantes de paclitaxel en présence d’un signal TCR, les Teff CD73<sup>+</sup> résistent mieux que les Teff CD73<sup>neg</sup>. Nous observons également une sélection des Teff MDR1<sup>+</sup> dans les deux sous-types. L’analyse d’échantillons de sang de patientes atteintes de cancer du sein et

ayant reçu un traitement néo-adjuvant (paclitaxel et/ou doxorubicine) montre une augmentation de l'intensité d'expression de MDR1 sur les Teff CD73<sup>+</sup> par rapport à des patientes non traitées, bien que la protéine reste fonctionnelle dans les deux cas.

Ces données semblent indiquer l'existence d'une population de Teff MDR1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> identifiée au sein des Th1.17 qui pourrait être sélectionnée sous traitement par chimiothérapie et contribuer activement à la réponse immunitaire anti-tumorale.

# MDR1 and CD73 co-expression identifies a Th1.17 effector population resistant to chemotherapy treatment that could play a pivotal role in anti-cancer immunity

Bossennec M<sup>1,2</sup>, Di Roio A<sup>1,2</sup>, Rodriguez C<sup>1,2,3</sup>, Gourdin N<sup>1,2,3</sup>, Hubert M<sup>1,2</sup>, Durand I<sup>2,4</sup>, Battiston-Montagne P<sup>2,4</sup>, Caux C<sup>1,2,3</sup> and Ménétrier-Caux C<sup>1,2,3</sup> (✉ Co-last authorship)

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Center of Lyon (CRCL) Lyon, 69008, France

<sup>2</sup>Team “*Therapeutic targeting of the tumor cells and their immune stroma*”, Immunology Virology Inflammation (IVI) department, INSERM U-1052, CRCL, 69008 Lyon, France

<sup>3</sup>Department of Innovation and translational research, Centre Léon Bérard, Lyon, F-69008, France

<sup>4</sup>Cytometry platform, INSERM U-1052, Cancer Research Center of Lyon, F-69000 Lyon, France

## Abstract

The Multi-Drug Resistance transporter 1 (MDR1), coded by the *ABCB1* gene, is an ABC transporter able to exclude a wide set of xenobiotics and anti-cancer drugs from cells through an ATP-dependent process. MDR1 has been identified in several tumor cells as a chemoresistance-inducing molecule limiting intracellular drug accumulation. Paclitaxel and Doxorubicin used in treatment of breast and ovarian cancers, are known MDR1 substrates. Also observed on T cells, MDR1 is expressed on all CD8<sup>+</sup> T cell subsets whereas it is slightly expressed on naïve CD4<sup>+</sup> T cells and was recently evidenced as largely associated with a Th1.17 phenotype. Our team demonstrated that CD4<sup>+</sup> CD73-expressing effector T cells (Teff) are specifically enriched in Th1.17 and a transcriptomic analysis highlighted *ABCB1* as one of the genes discriminating the most CD73<sup>+</sup> from CD73<sup>neg</sup> Teff. The ecto-nucleotidase CD73 allows the degradation of extracellular AMP into immunosuppressive adenosine. In the tumor microenvironment, extracellular AMP can be provided by regulatory T cells that exhibit high levels of CD39 and lack MDR1 expression. Our study shows that CD73 and MDR1 expressions correlate in Teff. MDR1 is highly functional and contrary to CD73, is conserved at protein level during Teff proliferation. We also demonstrate that CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff delineate better the IL-17A<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells and that MDR1<sup>+</sup> Teff are more polyfunctional than the MDR1<sup>neg</sup>. When treated *in vitro* with increasing doses of Paclitaxel in presence of a TCR signal, CD73<sup>+</sup> Teff resist better than their CD73<sup>neg</sup> counterpart and MDR1<sup>+</sup> cells are selected in both subtypes. Analysis of blood samples from BC patients having received neo-adjuvant treatment (Paclitaxel and/or Doxorubicin) reveals an increased MDR1 expression intensity on CD73<sup>+</sup> Teff compared to untreated patients while the protein remains functional.

Altogether, these data point toward a MDR1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> population identified among Th1.17, which appears to be a potent Teff population that may be selected during chemotherapy and fully contribute to anti-cancer immunity.

## Introduction

CD4<sup>+</sup> Effector T cells (Teff) are acknowledged assets in the anti-tumor immune response in many types of solid tumors. Several targeted therapies are currently being developed to improve their functionality in order to increase anti-tumor immune responses. However, the high diversity of CD4<sup>+</sup> T helper (Th) subsets that co-exist and bear each their specificities need to be better understood to favor anti-tumor promoting T cells capacities. Among characterized subsets, Th1.17 display a strong polyfunctionality. They indeed produce many different pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-22), that appear beneficial in anti-tumor immune responses. Several studies have identified them in breast (BC) and ovarian (OC) cancers as well as in other solid tumors (Benevides et al., 2013; Martin-Orozco et al., 2009; Ye et al., 2013). Our team has recently evidenced that human Th1.17 are enriched within CD73<sup>+</sup> Teff (Gourdin et al., 2018).

CD73 is an ecto-nucleotidase responsible for the degradation of extracellular AMP into immunosuppressive adenosine (Ado). Production of Ado by this specific subset represents a negative autocrine regulation mechanism to hold back its pro-inflammatory features and avoid its erratic activation. In addition to its capacity to self-regulation *via* Ado production, we have evidenced that in blood CD73<sup>+</sup> Teff express significantly higher levels of the MDR1 transporter compared to its CD73<sup>neg</sup> counterpart, both at mRNA and protein level (Gourdin et al., 2018). MDR1 belongs to the ATP binding cassette (ABC) transporter family. Its primary function consists in the exclusion of many xenobiotic and drugs from the cytoplasm of cells, protecting several healthy tissues from external aggression (Borst and Elferink, 2002; Thiebaut et al., 1987). Its aberrant or over-expression has also been described in tumor cells where it contributes to chemotherapy resistance by decreasing intracellular level of chemotherapeutic agents (Abolhoda et al., 1999; Haber et al., 2006; Vaidyanathan et al., 2016). It is the case for many therapies including anthracyclins (Doxorubicin, Epirubicin), taxanes (Paclitaxel, Docetaxel) or vinca-alkaloids (Vinblastin, Vincristin). In BC, low drug resistance associated to MDR1 expression by tumor cells was reported so far, enabling their use in neo-adjuvant setting with consistent efficiency (Hegewisch-Becker et al., 1998).

MDR1 expression and function on immune cells in the tumor microenvironment on the contrary remains poorly documented so far and could be of interest to predict immune infiltrate remodeling under chemotherapy regimen as well as to develop new therapeutic combinations, taking this parameter into consideration. Several data depicting MDR1 expression on CD4<sup>+</sup> T cells showed that naïve T cells and regulatory T cells (Treg) don't express it (Dimeloe Sarah et al., 2014). It is however associated to Th1.17 phenotype and largely involved in Crohn disease (Ramesh et al., 2014).

We investigated more in depth MDR1 expression and function on CD73<sup>+</sup> Teff and evidenced that MDR1 delineates the most polyfunctional Teff, both in CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> subpopulations. MDR1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> Teff are also able to withstand high Paclitaxel doses *in vitro*. *Ex vivo*, we evidenced a highly consistent expression of MDR1 on Teff in the blood and also in the primary tumor of patients treated with Paclitaxel-based chemotherapy in neo-adjuvant setting. Altogether these data suggest that this polyfunctional Teff population, with potent anti-tumor properties could be selected in the tumor microenvironment of neo-adjuvant treated BC patients.

## Material and Methods

### *Human samples*

Healthy donor (HD) blood was purchased anonymously from the French Blood Service (EFS). In addition, blood samples were obtained from patients with non-pretreated and chemotherapy-pretreated primary BC at time of surgery. In case of neo-adjuvant treated patients, blood samples were obtained at time of surgery namely 3 weeks to 1.5 month after the last chemotherapy cure. Primary tumor samples from untreated BC and OC patients were also obtained. All of these samples were provided by the tissue bank (BRC) of Léon Bérard Cancer Center (CLB), after approval from the institutional review board and ethics committee (L-06-36 and L-11-26) and patients' written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki.

### *Purification of the different CD4<sup>+</sup> T cell subsets*

PBMC were purified from blood of HDs or cancer patients by Ficoll density gradient. Memory CD4<sup>+</sup> T cells were purified using MojoSort Human CD4<sup>+</sup> Memory T Cell Isolation Kit (Biolegend). CD73<sup>neg</sup>Teff (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>CD73<sup>neg</sup>CD39<sup>neg</sup>), CD73<sup>+</sup> Teffs (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup>CD127<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>CD73<sup>+</sup>CD39<sup>neg</sup>) were sorted from purified memory CD4<sup>+</sup> T cells by multi-parametric flow cytometry (FC) (FACSAria III, BD Biosciences) using antibodies against CD25 (2A3, BD-Biosciences), CD45RA (2H4LDH11LDB9, Beckman-Coulter), as well as CD127 (eBioRDR5), CD39 (eBioA1) and CD73 (AD2) (all from Life Technologies), alongside a viability marker (DAPI). Single cell suspensions from breast and ovarian tumors were obtained after enzymatic disaggregation (Gobert et al., 2009).

### *Flow cytometry analyses*

Multi-parametric FC analyses were performed on PBMCs from HDs or cancer patients, or on single cell suspensions derived from primary breast and ovarian tumors. The panels used to

assess MDR1 expression on T cell populations were performed in a two-step staining. MDR1 staining was first performed using an anti-human MDR1 antibody (UIC2, Life Technologies) for 20 min at 37°C in the presence of Cyclosporin A (25 µM, R&D Systems), as described previously (Dimeloe Sarah et al., 2014).

Cells were then washed and stained with a standard procedure at 4°C with the following set of antibodies: CD45 (HI30), CD3 (UCHT1), CCR7 (150503) (all from BD-Biosciences), CD45RA (HI100, Biolegend), CD8 (RPA-T8, Beckman Coulter), CD4 (RPA-T4), CD39 (A1) and CD73(AD2) (Life Technologies).

To evaluate MDR1 expression on Th subsets, the second staining was performed using: CD45, CD3, CD4, CD45RA, CD39 and CD73 (see above), CCR6 (11A9), CRTH2 (BM16) (both from BD-Biosciences), CXCR3 (REA, Miltenyi Biotec) and a viability marker (Zombie dye, Biolegend).

The production of intracellular cytokines on CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup>Teff was analyzed using the test previously described (Mandathil et al., 2010) with the evaluation of IL-22 (22URTI, BD-Biosciences) instead of IL-21. Cells were analyzed on a LSR-Fortessa (BD-Biosciences) and data were processed using the FlowJo v10.4 Software (Tree Star). For the analysis of cytokines co-production, data were analyzed using the Boolean method on the FlowJo software and then represented using Pestle and SPICE v5.3 softwares.

#### *Rh123 assay to assess MDR1 functionality*

Total PBMC of HD or BC patients were re-suspended at 1.10<sup>6</sup>cells/ml in complete RPMI medium (1% Penicillin-Streptomycin, 10% FBS) containing Rh123 (1µg/ml, Sigma-Aldrich) and incubated on ice for 30 min. After two washes in PBS, cells were incubated at 37°C for a 2h efflux phase. Cells were then washed in PBS and stained with surface markers for FC analysis as described above. In some conditions, a MDR1 inhibitor, Elacridar (1µM, Tocris) was added immediately before the efflux phase to confirm the MDR1-specific efflux. Cells were analyzed by FC (LSR Fortessa) immediately after extra-cellular staining.

#### *Test of MDR1-mediated drug resistance*

Sorted CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff were respectively stained with CTV and CFSE as previously described (Gourdin et al., 2018). Cells were then incubated in 96 round-bottom well plates with anti CD3/anti-CD28 beads coated beads (Expand beads Life Technologies) at a ratio beads to cells 1:4 with increasing doses of Paclitaxel (1nM to 20nM, TEVA) in cRPMI in presence of 50UI IL-2 (Chiron). Both cell subtypes were either cultivated alone or mixed at a physiological ratio (CD73<sup>+</sup> Teff/ CD73<sup>neg</sup> Teff 1:10). After 96h of culture, cells were harvested

and stained for MDR1 expression and viability (Zombie dye, Biolegend) before their analysis by FC.

### *Cytokines quantification*

Supernatants of sorted CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff cultured according to the previously described method (*cf.* test of MDR1-mediated drug resistance) were processed for multi-parametric cytokine quantification. Using a customized U-Plex assay (Meso Scale Discovery®), production levels of GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-22, IL-13, IL-4 and TNF- $\alpha$  were assessed.

### *Statistical analysis*

When suited, data formatting and statistical tests were performed using Prism software (Graphpad Inc.). Parametric tests were performed on healthy donors' (HD) data. *in vitro* drug tests and data collected on patients' samples were analyzed using non parametric tests due to small number of samples.

## **Results**

### ***Functional MDR1 is associated to CD73 expression in CD4<sup>+</sup> memory T cell populations***

According to previously described method (Dimeloe Sarah et al., 2014), we assessed MDR1 expression by FC on both naïve and memory CD4<sup>+</sup> T cells and also discriminated effector memory (T<sub>EM</sub>), central memory (T<sub>CM</sub>) and effector memory CD45RA<sup>+</sup> (T<sub>EMRA</sub>) T cells using CD45RA/CCR7 marker combination (**Supp Fig.1**). We confirmed previous data (Dimeloe Sarah et al., 2014) showing lack of MDR1 expression on Treg and observed a higher percentage and intensity of MDR1 expression on memory T cells compared to naïve ones (**Supp Fig.2A-C**). Focusing our analysis of MDR1 expression on Teff subsets based on CD73 expression, we showed it is significantly more frequent on CD73<sup>+</sup> Teff compared to CD73<sup>neg</sup> Teff (43,9 $\pm$ 1,8% vs. 17,6 $\pm$ 1%) (**Fig.1A**), confirming transcriptomic analysis published previously (Gourdin et al., 2018). No significant difference in intensity of MDR1 expression was however observed between CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> subsets (**Fig.1B**). The discrepancy between CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff was conserved when considering T<sub>EM</sub>, T<sub>CM</sub> and T<sub>EMRA</sub> populations (**Fig.1C**). We also evidenced that MDR1 expression pattern is highly different in CD8<sup>+</sup> T cells. It is indeed largely expressed among CD8<sup>+</sup> T cells with 86,2 $\pm$ 1,4% of MDR1<sup>+</sup> cells in naïve CD8<sup>+</sup> T cells and 63,1 $\pm$ 2,1% of MDR1<sup>+</sup> cells among CD8<sup>+</sup> memory subset (**Supp Fig.2D**) without significant difference in expression intensity (**Supp Fig.2E**). Interestingly, we also showed a significant



association between CD73 and MDR1 expression both in frequency and MFI, and we evidenced that the cells bearing the highest levels of MDR1 were CD73<sup>+</sup> (**Supp Fig.2F-G**). A more detailed analysis of MDR1 expression on CD8<sup>+</sup> memory subsets highlighted that MDR1 expression is slightly reduced on T<sub>CM</sub> compared to T<sub>EM</sub> and T<sub>EMRA</sub> cells (**Supp Fig.2H**). Moreover, a significantly higher expression of MDR1 on CD73<sup>+</sup> cells can be identified in T<sub>CM</sub> and T<sub>EM</sub> compartments but is not observed in T<sub>EMRA</sub> cells (**Supp Fig.2I**). Ramesh *and colleagues*, reported a strong association of MDR1 expression and Th1.17 phenotype among CD4<sup>+</sup> memory T cells (Ramesh et al., 2014). We confirmed this and also demonstrated that among Th1.17 and Th17, CD73<sup>+</sup> cells were the one expressing the highest MDR1 level (**Fig.1D**). Performing Rh123 assay described as functional test to assess MDR1 exclusion capacities (Ludescher et al., 1991) in parallel with MDR1 expression (**Fig.1E**), we demonstrated a strong positive correlation ( $R^2= 0.7355$ ) between MDR1 expression and Rh123 exclusion in CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff and highlighted a higher efflux capacity of CD73<sup>+</sup>Teff (**Fig.1F**). Among Th1.17, CD73<sup>+</sup> Teff were therefore also the one displaying the strongest MDR1 expression.

### ***MDR1 delineates the most polyfunctional Teff in both CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> subtypes***

Considering the association between Th1.17 phenotype and MDR1/CD73 expression, we analyzed cytokine production by the different subsets (CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>neg</sup>, CD73<sup>neg</sup>MDR1<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup>MDR1<sup>neg</sup>) after PMA ionomycin reactivation. CD73<sup>+</sup> Teff were already shown to be enriched in polyfunctional T cells compared to CD73<sup>neg</sup> Teffs (Gourdin et al., 2018). When analyzed based on their MDR1 expression, we evidenced a higher polyfunctionality of the MDR1<sup>+</sup> populations with two-fold more CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff and 4,5 fold more CD73<sup>neg</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff secreting 3 or more cytokines compared to CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>neg</sup> and CD73<sup>neg</sup>MDR1<sup>neg</sup> cells respectively (**Fig.2A-B**). Considering CCR6<sup>+</sup> cells, regrouping both Th1.17 and Th17 subsets, we showed that CCR6<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> Teff expressing MDR1 secreted more IL-17A than their MDR1<sup>neg</sup> counterpart. Cells co-producing IL-17A and IFN $\gamma$  and corresponding to Th1.17 were also overwhelmingly MDR1<sup>+</sup> cells among CD73<sup>+</sup> Teff (**Fig.2C**). Altogether, these data provide intel on the characterization of polyfunctional Teffs, showing a significant association between MDR1 expression and Teff polyfunctionality both among CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> populations.

### ***MDR1 expression is stably expressed in activated Teff and allows preferential resistance of high MDR1 expressing CD73<sup>+</sup> Teff***

Having validated that MDR1 is functional on Teff, we hypothesized that MDR1<sup>+</sup> Teff would resist more efficiently *in vitro* to sustained exposure to chemotherapy molecules substrates of

MDR1. Considering our read out using FC, we ruled out the use of Doxorubicin or any anthracyclins because of their fluorescent property that might interfere in the analyses. We therefore selected Paclitaxel that is widely used in BC neo-adjuvant treatments. Sorted CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff were activated *in vitro* with Expand-beads in cRPMI or in presence of increasing Paclitaxel doses (1 to 20nM). We first evidenced that, contrary to CD73, which is lost on proliferating CD73<sup>+</sup> Teff, MDR1 remains stably expressed on both subsets (**Fig. 3A**). Because CD73<sup>+</sup> Teff lose CD73 expression upon proliferation, we stained CD73<sup>+</sup> Teff and CD73<sup>neg</sup> Teff with CTV and CFSE respectively before mixing them back together at a physiological ratio (1:10). This double staining enabled us to track CD73<sup>+</sup> Teff in the mix, while assessing their proliferation (**Supp Fig. 3A**). After 4 days of stimulation, we showed that both subsets were significantly enriched in MDR1 expressing cells when treated with high doses Paclitaxel (**Fig. 3B**). Of importance, proliferation capacity of CD73<sup>+</sup> Teff was not significantly affected by Paclitaxel treatment contrary to CD73<sup>neg</sup> Teff, which proliferated less efficiently in presence of 20nM Paclitaxel (95,4±3,2% vs. 77,7±6,8%) (**Fig. 3C**). Moreover, CD73<sup>neg</sup> Teff resist less efficiently to sustained exposure to Paclitaxel *in vitro* as revealed by their decreased viability in presence of 20nM Paclitaxel in contrast to the CD73<sup>+</sup> Teff that remain viable (**Supp Fig. 3B**). As a consequence, after 96h activation with Paclitaxel, a dose-dependent increase of CD73<sup>+</sup> Teff frequency was obtained in the mix reflecting their higher viability and proliferation compared to CD73<sup>neg</sup> Teff.

Previous data demonstrated that Paclitaxel treatment affects cytokine secretion by immune cells (Panis et al., 2012; Zhang et al., 2008). Considering the behavior of each subset after drug treatment, we quantified supernatant cytokines content of sorted cells activated separately (**Fig. 3E**). CD73<sup>+</sup> Teff incubated with 20nM Paclitaxel produced significantly higher quantities of GM-CSF, IFN- $\gamma$  and IL-17A compared to medium condition. Paclitaxel increased also, but more weakly, CD73<sup>neg</sup> Teff GM-CSF and IFN- $\gamma$  production whereas production of IL-17A was strongly enhanced. CD73<sup>neg</sup> Teff also produced more IL-4 compared to medium condition. No changes in IL-22, TNF- $\alpha$  nor IL-13 production was noted in either subset. Taken together, these results showed that MDR1 is mainly associated to CD73<sup>+</sup> Teff which are enriched in Th1.17 and are able to withstand high dose Paclitaxel without losing their proliferating nor cytokine secretion capacities.

### ***MDR1 expression is upregulated on Teff in BC patients receiving neo-adjuvant chemotherapy***

Blood was obtained from BC patients at the time of surgery. We observed no significant difference in the frequency of CD73<sup>+</sup> cells among Teff in the blood of treated patients compared to HDs (**Fig. 4A**). MDR1 frequency and intensity was nonetheless significantly higher on neo-adjuvant treated patients compared to untreated patients with comparable tumor

aggressiveness (**Fig. 4B**). When analyzing specifically MDR1 expression on CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff, we showed an increased MDR1 frequency in both subtypes (**Fig. 4C**). MDR1 intensity was however mostly enhanced on CD73<sup>+</sup> Teff (**Fig. 4D**). MDR1 remains functional on blood Teff from BC patients as demonstrated by Rh123 assay. We however observed that less CD73<sup>neg</sup> Teff from untreated patients (**Fig. 4E left**) exclude Rh123 compared to neo-adjuvant treated ones (**Fig. 4E right**), consistent with their increased MDR1<sup>+</sup> frequency (**Fig. 4B**). Performing PMA/ionomycin reactivation on total PBMC of neo-adjuvant treated BC patients, we showed that a substantially higher functionality of MDR1<sup>+</sup> Teff is conserved upon treatment although no significance is reached (**Fig.4F**).

In parallel, we analyzed MDR1 expression on Teff in primary BC and OC tumors samples from untreated patients and evidenced the preferential expression of MDR1 on tumor infiltrating CD73<sup>+</sup>Teff (**Fig.4G**), suggesting that they could also be conserved *in situ* upon MDR1 substrates-mediated chemotherapy regimen.

## Discussion

CD73<sup>+</sup> Teff encompass a population of highly polyfunctional T cells. Our team showed that these cells express low levels of inhibitory immune checkpoints (Gourdin et al., 2018), suggesting CD73 as a negative regulator for this pro-inflammatory population. In addition to their specific expression of CD73, CD73<sup>+</sup> Teff also display a high expression of the multidrug transporter MDR1, well reviewed in the past years for its chemo resistance induction in several types of tumors. In this study we evidence that the expression of this transporter is associated with a high polyfunctionality of Teff that may be of particular interest in anti-tumor immune response. We analyzed CD73 and MDR1 expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations and evidenced a correlation between both markers in both compartments. This suggests a common regulation of both molecules in T cells. This is reinforced by the fact that MDR1 is also associated to CD161 expression on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Alsuliman et al., 2017; Dusseaux et al., 2011; Fergusson et al., 2016). CD161 expression in T cells is closely related to Th17 phenotype and we confirmed that it is more expressed on CD73<sup>+</sup> Teff compared to CD73<sup>neg</sup> Teff (data not shown). It can also be noted that hypoxia is a common regulator of CD73 and MDR1, enhancing their expression in both cases (Comerford et al., 2002; Synnestvedt et al., 2002).

Among CD4<sup>+</sup> T cells, MDR1 is closely correlated to CD73 expression in memory T cells especially in Th17 and Th1.17, previously described as Th populations enriched in MDR1<sup>+</sup> cells (Ramesh et al., 2014). We showed that MDR1<sup>+</sup> Teff display a higher polyfunctionality in term of cytokines secretion compatible with Th17/Th1.17 profile.

Of great interest, our results show that whereas CD73 loss is required to allow proliferation by blocking Ado generation, MDR1 levels remain stably expressed during proliferation. This implies that even while proliferating, MDR1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> Teff keep their ability to exclude drugs from their cytoplasm allowing them to expand even in presence of xenobiotics or anti-mitotic drugs. MDR1 expression associated to this particularly pro-inflammatory and polyfunctional state could be related to their function throughout the tissues. Cao *et al.* indeed recently demonstrated that MDR1 expression on Th cells has a crucial role in the ileum where it prevents Th activation by bile acids that may increase their production of ROS if not excluded from the cells (Cao et al., 2017). Concomitantly, the intestine is a tissue particularly enriched in Th1.17 that interact with the host commensal flora (Duhon and Campbell, 2014) and our team also demonstrated that healthy colon tissue is enriched in CD73<sup>+</sup> Teff (Gourdin et al., 2018). The large expression of MDR1 by polyfunctional CD73<sup>+</sup> Teff could therefore ensure their survival and proliferation in the specific intestine environment where their role in host defense cannot be circumvented. Depending on the pathological context, resistance of these cells to MDR1 substrates based therapy can be of interest or on the contrary detrimental. In the context of Crohn disease in which resistance to Glucocorticoids is associated to MDR1 expression by Th17 cells, it can be detrimental to therapy efficiency (Ramesh et al., 2014). In tumor microenvironment, the presence of CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff could however present an advantage when considering therapeutic strategy, particularly implicating MDR1 substrates based chemotherapies. Several teams have indeed shown that chemotherapy treatments shape the immune infiltrate in solid tumors, notably with Paclitaxel which is a substrate of MDR1 (Coleman et al., 2005). Treg burden as well as their inhibitory functions were reported decreased in Paclitaxel-based chemotherapy notably in non-small cell lung cancer (Zhang et al., 2008) and advanced OC (Wu et al., 2010). This effect may be in part explained by the lack of MDR1 expression on Treg reported by us and others (Dimeloe Sarah et al., 2014). Paclitaxel treatment has been also associated with an increase in Th1-type cytokines production (Panis et al., 2012; Zhang et al., 2008) suggesting that chemotherapy effect could be in part mediated by cytokine signaling resulting from a host immune cell activation. *In vitro* we confirmed that Teff exposure to graded doses of Paclitaxel for several days, increases their cytokine production compared to control condition. In addition to resisting better to Paclitaxel treatment because of their high MDR1 expression, CD73<sup>+</sup> Teff could therefore contribute to activate the anti-tumor response by secreting high levels of pro-inflammatory cytokines. However, *in vivo*, this effect of chemotherapy upon cytokine production by T cells seems transitory and presents different “time windows” according to the T cell subset considered (Coleman et al., 2005; Wu et al., 2010). CD4<sup>+</sup> T cells produce quickly high amount of cytokines following chemotherapy administration while there is more latency for CD8<sup>+</sup> T cells. The effects we observed *in vitro* might therefore not be valid after a longer period of culture. These observations are to be taken

into account when combining chemotherapy with immunotherapy strategies to make the most out of the combination according to the immune subset targeted.

We also showed higher MDR1 proportions within peripheral blood Tef from BC patients treated with Paclitaxel in neo-adjuvant setting compared to untreated patients. Moreover, Paclitaxel treatment doesn't impact MDR1 function implying that the protective effect provided by MDR1 can last during chemotherapy regimen. Since we showed that MDR1 remains highly expressed on proliferating Teffs, we can also infer that activated Teff will conserve MDR1 protective effect upon immune response reactivation. Cytokine production pattern potential of Teff from neo-adjuvant treated patients revealed by PMA/ionomycin reactivation remains comparable to that of HD. This strongly contrasts with the increased cytokines concentrations observed in supernatants of Teffs from HDs that have been exposed *in vitro* to graded doses of Paclitaxel. The cytokines for which production was modulated by Paclitaxel treatment were mainly Th1.17 cytokines produced predominantly by MDR1<sup>+</sup> cells. The global increase in GM-CSF, IFN- $\gamma$  and IL-17A observed could therefore reflect the selection of these MDR1<sup>+</sup> cells upon Paclitaxel treatment.

The discrepancy observed between experiments performed *in vitro* on HD blood and *ex vivo* on neo-adjuvant pretreated patient's blood could result from the different activation strengths and pathways used for both experiments. Moreover, time lapse between treatment administration and sample collection must be taken into account. It has indeed been shown that chemotherapy impact on cytokine production is time limited (Chang et al., 2013; Zhang et al., 2008). The delay of up to several weeks between last chemotherapy cure and blood analysis could therefore explain the absence of difference between patients and HD. Obtaining of patients' blood samples under treatment will help to assess this point. Moreover, the study also needs to be completed with the analysis of short term reactivation (PMA/ionomycin) of blood samples from untreated BC patients to evaluate if cytokine pattern is nonetheless increased in neo-adjuvant treated patients compared to untreated ones.

We also showed that MDR1<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>Teff infiltrate the tumor microenvironment of untreated primary breast and ovarian tumors. In addition, the discrepancy of MDR1 expression between CD73<sup>neg</sup> and CD73<sup>+</sup> Teff is conserved in the tumor. The phenotypic and functional analysis of samples of neo-adjuvant treated tumor samples having or not responded to chemotherapy will be of major importance in our future investigations to better evaluate the role of CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff in anti-tumor response and see if its abundance and function correlate with response to treatment.

CD73<sup>+</sup> Teff present interesting properties to contribute to anti-tumor response while they are not producing Ado due to CD73 activity. It was reported in a mouse model of mammary tumor that blockade of CD73 or A2aR increases Doxorubicin mediated anti-tumor immune response and prolonged survival of mice with established mammary tumors (Loi et al., 2013).

Interestingly enough, Doxorubicin is also a MDR1 substrate both in human and mouse. We can therefore expect that the synergistic effect observed between Doxorubicin and anti-CD73 therapy will promote tumor cell death and limit the production of the immunosuppressive Ado to enhance anti-tumor response. One should however keep in mind that since murine Treg express CD73, the combination treatment used could also have a strong effect on Treg burden and accentuate even more tumor reduction. Targeting Ado pathway concomitantly to chemotherapy appears nonetheless important since chemotherapeutic agents can cause an increase in Ado release due to tumor cell death, and favor an immunosuppressive environment (Long et al., 2013). It is therefore worth considering a combination of MDR1 substrates-based chemotherapy and immunotherapy targeting CD73 enzymatic function to conserve the anti-tumor CD73 Teff in the tumor microenvironment and favor its cytokine production in absence of Ado. Blocking A2R could also be required to prevent immunosuppression mediated by Ado produced by surrounding cells. In tumor context, where immune response re-activation is required to improve tumor regression, CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> Teff could therefore be an interesting asset in the re-establishment of an efficient anti-tumor immune response.

## **Acknowledgments**

We wish to thank the staff of the core facilities at the Cancer Research Center of Lyon (CRCL) for their technical assistance and the BRC (Biological Resources Centre) of the CLB for providing human samples.

## **Fundings**

This work has been financially supported by the Breast Cancer Research Foundation (BCRF), grants from the Puy de Dôme comity of the “Ligue Contre le Cancer”, the SIRIC project (LyriCAN, grant no. INCa-DGOS-Inserm\_12563), the FP7 European TumAdoR project (grant n° 602200) and the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of the University of Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” organized by the French National Research Agency (ANR).

## **Competing interest**

None

## References

- Abolhoda, A., Wilson, A.E., Ross, H., Danenberg, P.V., Burt, M., and Scotto, K.W. (1999). Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 3352–3356.
- Alsuliman, A., Muftuoglu, M., Khoder, A., Ahn, Y.-O., Basar, R., Verneris, M.R., Muranski, P., Barrett, A.J., Liu, E., Li, L., et al. (2017). A subset of virus-specific CD161+ T cells selectively express the multidrug transporter MDR1 and are resistant to chemotherapy in AML. *Blood* *129*, 740–758.
- Benevides, L., Cardoso, C.R.B., Tiezzi, D.G., Marana, H.R.C., Andrade, J.M., and Silva, J.S. (2013). Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1518–1528.
- Borst, P., and Elferink, R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 537–592.
- Cao, W., Kayama, H., Chen, M.L., Delmas, A., Sun, A., Kim, S.Y., Rangarajan, E.S., McKeivitt, K., Beck, A.P., Jackson, C.B., et al. (2017). The Xenobiotic Transporter Mdr1 Enforces T Cell Homeostasis in the Presence of Intestinal Bile Acids. *Immunity* *47*, 1182–1196.e10.
- Chang, C.-L., Hsu, Y.-T., Wu, C.-C., Lai, Y.-Z., Wang, C., Yang, Y.-C., Wu, T.-C., and Hung, C.-F. (2013). Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response. *Cancer Res.* *73*, 119–127.
- Coleman, S., Clayton, A., Mason, M.D., Jasani, B., Adams, M., and Tabi, Z. (2005). Recovery of CD8+ T-Cell Function During Systemic Chemotherapy in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Res.* *65*, 7000–7006.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., and Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Res.* *62*, 3387–3394.
- Dimeloe Sarah, Frick Corina, Fischer Marco, Gubser Patrick M., Razik Leyla, Bantug Glenn R., Ravon Morgane, Langenkamp Anja, and Hess Christoph (2014). Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* *44*, 3614–3620.
- Duhen, T., and Campbell, D.J. (2014). IL-1 $\beta$  Promotes the Differentiation of Polyfunctional Human CCR6+CXCR3+ Th1/17 Cells That Are Specific for Pathogenic and Commensal Microbes. *J. Immunol.* *193*, 120–129.
- Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Bourhis, L.L., Soudais, C., Treiner, E., et al. (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17–secreting T cells. *Blood* *117*, 1250–1259.

Fergusson, J.R., Hühn, M.H., Swadling, L., Walker, L.J., Kurioka, A., Llibre, A., Bertolotti, A., Holländer, G., Newell, E.W., Davis, M.M., et al. (2016). CD161(int)CD8<sup>+</sup> T cells: a novel population of highly functional, memory CD8<sup>+</sup> T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol.* 9, 401–413.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69, 2000–2009.

Gourdin, N., Bossennec, M., Rodriguez, C., Vigano, S., Machon, C., Jandus, C., Bauché, D., Faget, J., Durand, I., Chopin, N., et al. (2018). Autocrine Adenosine regulates tumor polyfunctional CD73<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> effector T cells devoid of immune checkpoints. *Cancer Res.*

Haber, M., Smith, J., Bordow, S.B., Flemming, C., Cohn, S.L., London, W.B., Marshall, G.M., and Norris, M.D. (2006). Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 1546–1553.

Hegewisch-Becker, S., Staib, F., Löning, T., Pichlmeier, U., Kröger, N., Reymann, A., and Hossfeld, D.K. (1998). No evidence of significant activity of the multidrug resistance gene product in primary human breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 9, 85–93.

Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P.A., Darcy, P.K., Smyth, M.J., and Stagg, J. (2013). CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11091–11096.

Long, J.S., Crighton, D., O’Prey, J., Mackay, G., Zheng, L., Palmer, T.M., Gottlieb, E., and Ryan, K.M. (2013). Extracellular adenosine sensing—a metabolic cell death priming mechanism downstream of p53. *Mol. Cell* 50, 394–406.

Ludescher, C., Gattringer, null, Drach, J., Hofmann, J., and Grunicke, H. (1991). Rapid functional assay for the detection of multidrug-resistant cells using the fluorescent dye rhodamine 123. *Blood* 78, 1385–1387.

Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E.K., Gorelik, E., and Whiteside, T.L. (2010). Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Biol. Chem.* 285, 7176–7186.

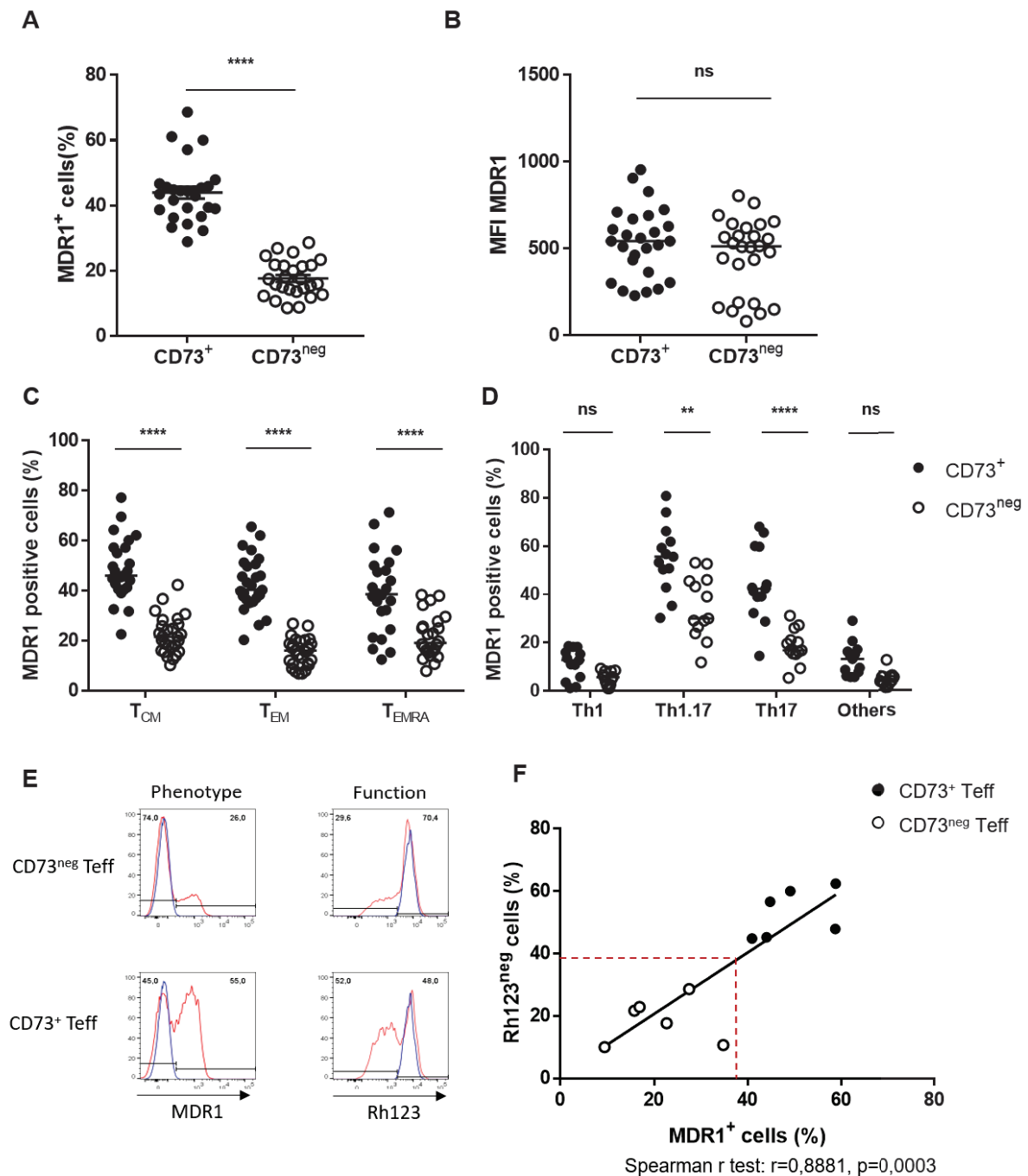
Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31, 787–798.

Panis, C., Lemos, L.G.T., Victorino, V.J., Herrera, A.C.S.A., Campos, F.C., Colado Simão, A.N., Pinge-Filho, P., Cecchini, A.L., and Cecchini, R. (2012). Immunological effects of taxol and adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 61, 481–488.



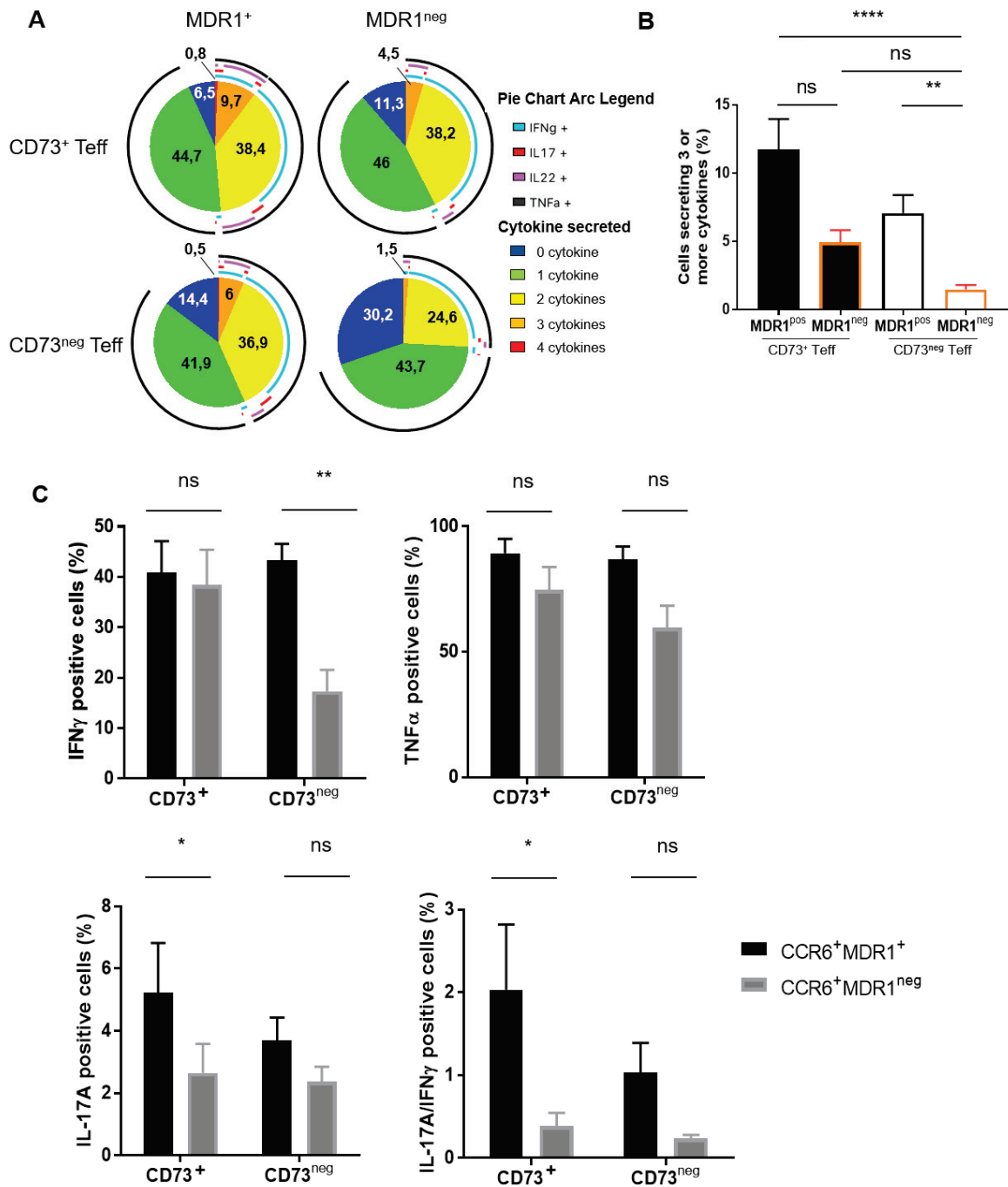
- Ramesh, R., Kozhaya, L., McKeivitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., and Sundrud, M.S. (2014). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J. Exp. Med.* *211*, 89–104.
- Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F., and Colgan, S.P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* *110*, 993–1002.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7735–7738.
- Vaidyanathan, A., Sawers, L., Gannon, A.-L., Chakravarty, P., Scott, A.L., Bray, S.E., Ferguson, M.J., and Smith, G. (2016). ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer* *115*, 431–441.
- Wu, X., Feng, Q.-M., Wang, Y., Shi, J., Ge, H.-L., and Di, W. (2010). The immunologic aspects in advanced ovarian cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 279.
- Ye, J., Livergood, R.S., and Peng, G. (2013). The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am. J. Pathol.* *182*, 10–20.
- Zhang, L., Dermawan, K., Jin, M., Liu, R., Zheng, H., Xu, L., Zhang, Y., Cai, Y., Chu, Y., and Xiong, S. (2008). Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *129*, 219–229.

# Main figures and supplementary

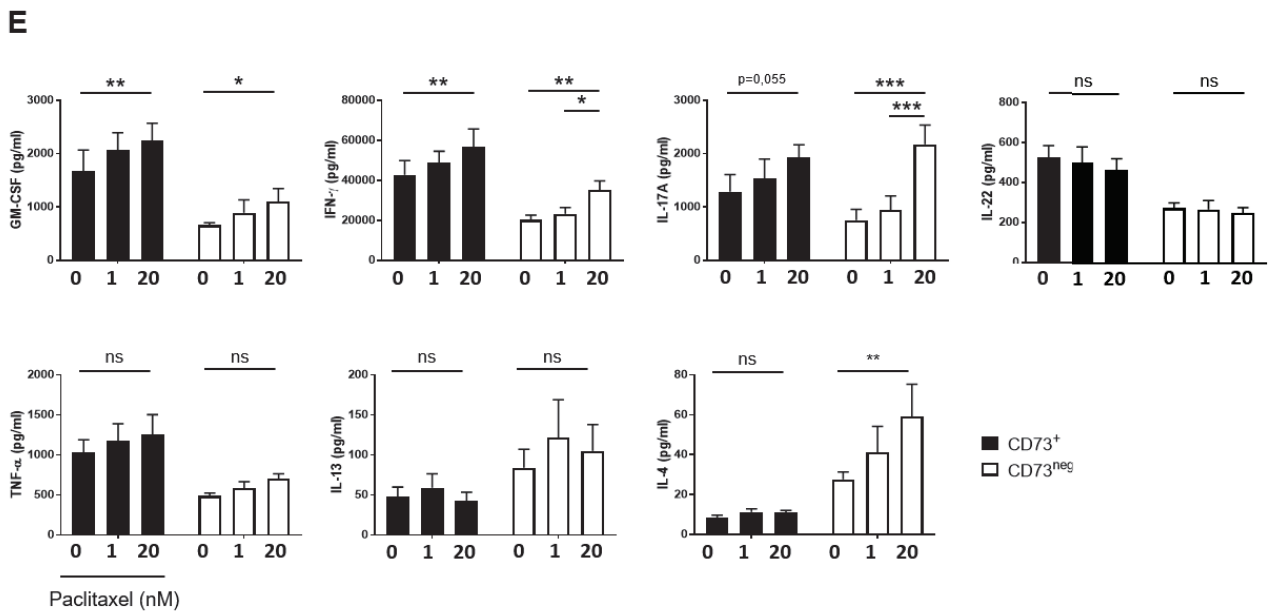
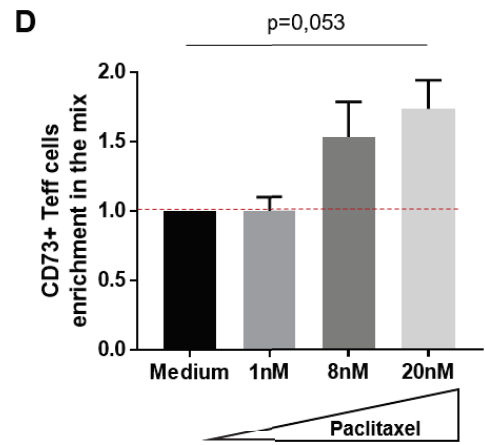
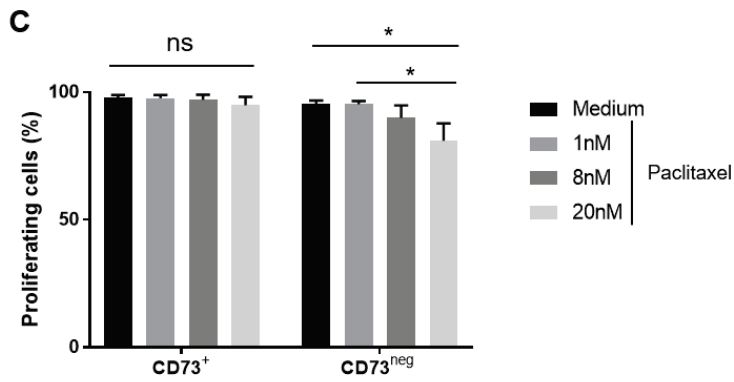
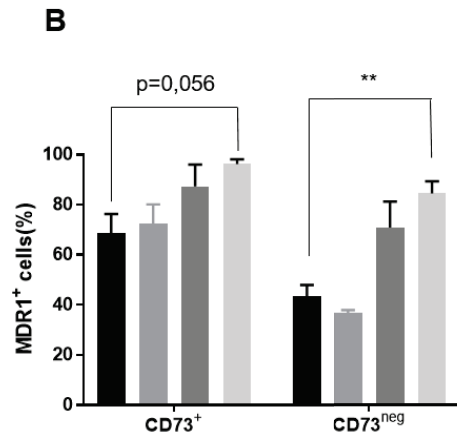
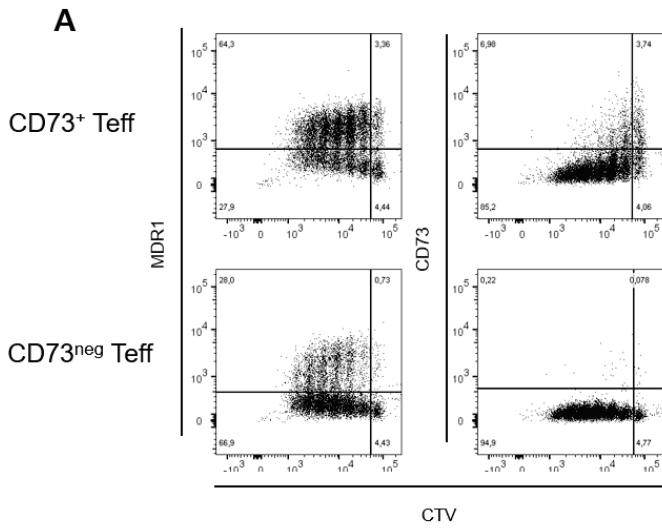


**Figure 1: MDR1 is preferentially associated to CD73 expression in CD4<sup>+</sup> Teffs and is functional. A-B.** MDR1 frequency (A) and MFI (B) on total CD4<sup>+</sup> Teff based on their CD73 expression. **C-D.** MDR1 expression on Teff subsets (T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub>, T<sub>EMRA</sub>) (C) and on Th1, Th1.17, Th17, and other Th subsets according to CD73 expression (D). **E.** Representative histogram of phenotypic (MDR1 staining) and functional (Rh123 assay) consistency in

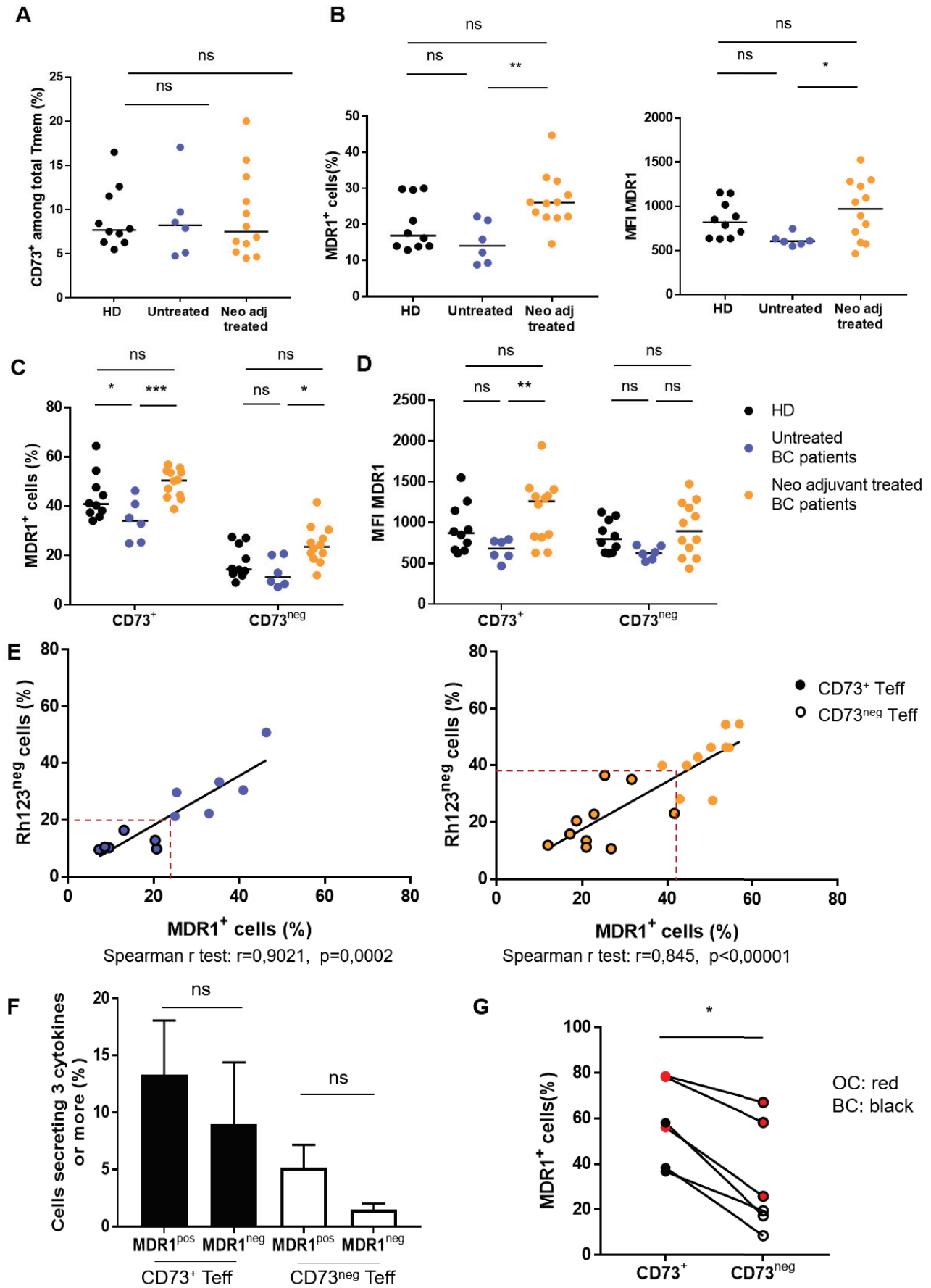
CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Tregs. **F.** Correlation of phenotype and function of MDR1 on CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Tregs from HD. A-B: ANOVA-1, C-D: ANOVA- 2, F: Spearman r test. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001, \*\*\*\*: p<0,0001.



**Figure 2: MDR1 delineates the most polyfunctional Teffs.** **A.** SPICE representation of intracellular production of cytokines by CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teffs based on MDR1 expression (n=9). **B.** Cumulative percentage of cells secreting  $\geq 3$  cytokines among CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teffs stratified on MDR1 expression (n=10). **C.** Cytokine production by CCR6<sup>+</sup> cells among CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teffs based on MDR1 expression (n=6). B: Kruskal-Wallis test, C: ANOVA-2. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*\*: p<0,0001

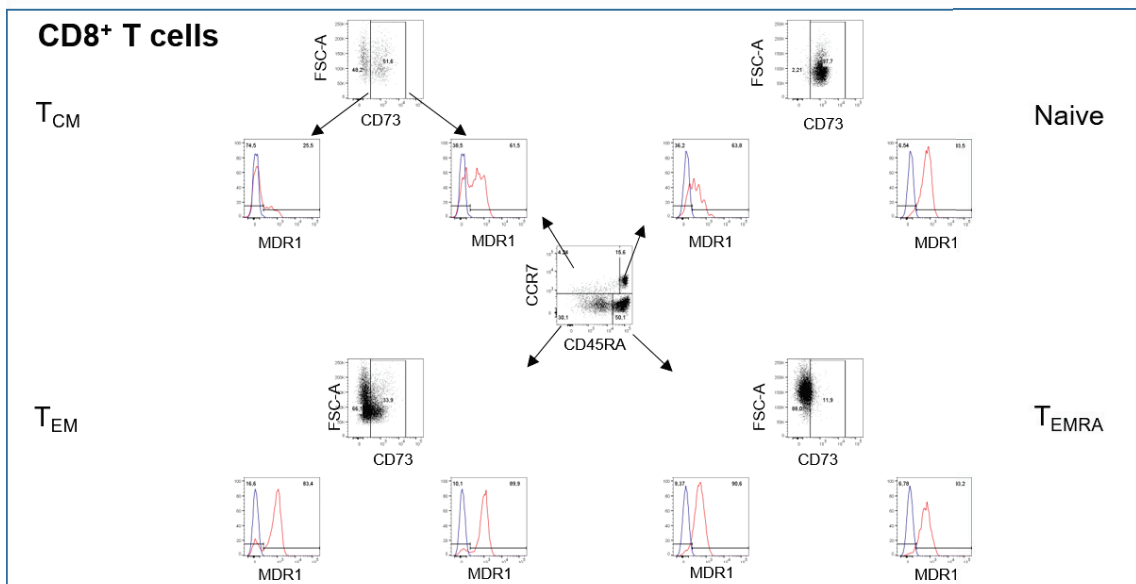
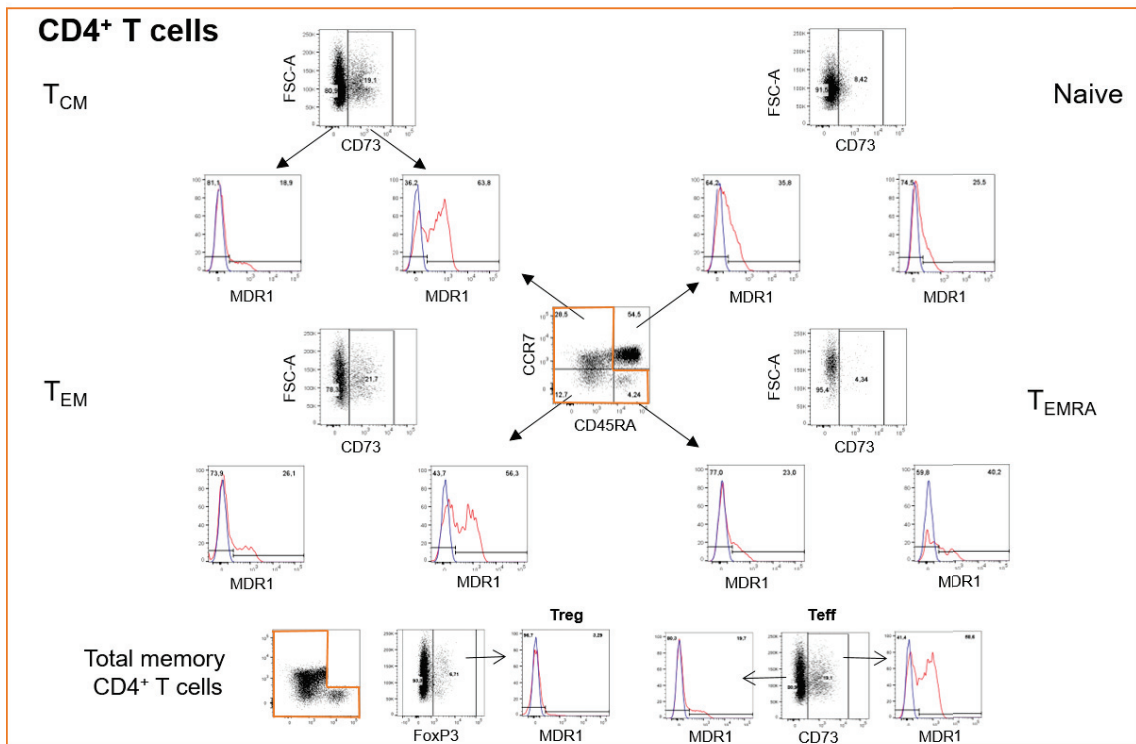
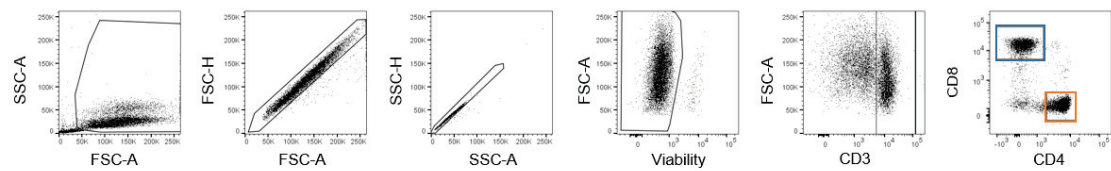


**Figure 3: MDR1 expression is stable in activated Teff and allows preferential resistance of highly MDR1 expressing CD73<sup>+</sup> Teff.** **A.** Representative facs plot of CD73 and MDR1 staining performed on sorted CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff activated *in vitro* for 4 days with expand beads and stained with proliferation tracker CTV. **B-C.** Percentage of MDR1<sup>+</sup> (**B**) and percentage of proliferating (**C**) CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff respectively stained with CTV and CFSE cell tracker in a mix (ratio CD73<sup>pos</sup>/CD73<sup>neg</sup>: 1:10) activated for 4 days with expand beads cultivated in complete medium with or without increasing doses of Paclitaxel. **D.** CD73<sup>pos</sup> Teff enrichment in the mix of cells activated with Paclitaxel compared to medium. **E.** Cytokine production assessed by multiparametric immunoassay in the supernatant of sorted CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Teff cultivated for 4 days with expand beads in medium condition or with Paclitaxel (1 and 20nM). B, C, D: ANOVA-2, E: Kruskal-Wallis test. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001. **B-E**, n=3.

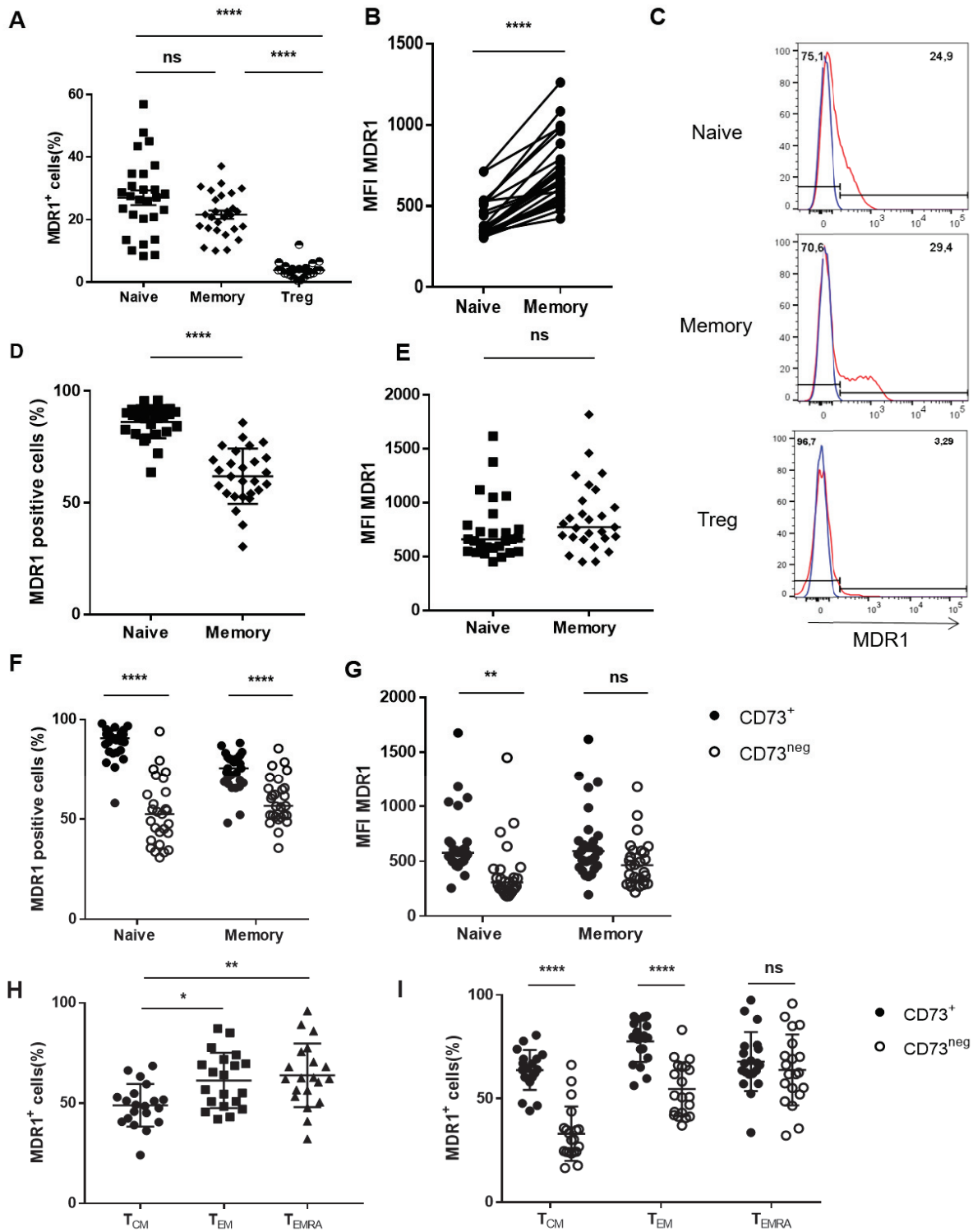


**Figure 4: MDR1 expression is upregulated on Tregs in blood of BC patients receiving neo-adjuvant treatment.** **A.** Frequency of CD73<sup>+</sup> subset among memory CD4<sup>+</sup> T cells in HD compared to untreated or neo-adjuvant treated BC patients. **B.** Percentage (left) and MFI (right) of MDR1<sup>+</sup> cells among memory CD4<sup>+</sup> T cells in HD vs untreated vs neo-adjuvant treated BC patients. **C-D.** Percentage (**C**) and MFI (**D**) of MDR1<sup>+</sup> cells among CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Tregs in HD and BC patients. **E.** Correlation of MDR1 phenotype and function on CD73<sup>pos</sup> and CD73<sup>neg</sup> Tregs from untreated (left) and neo-adjuvant treated (right) BC patients. **F.** Percentage of Tregs producing 3 or more cytokines among PBMC from neo adjuvant treated BC patients based on their CD73 and MDR1 expression and assessed after PMA-ionomycin reactivation (n=4). **G.** MDR1 expression assessed on intra tumor CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> Tregs. A-B: Kruskal-Wallis test, C-D: ANOVA-2, E: Spearman r test. F: ANOVA-2, G: Wilcoxon test \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001.



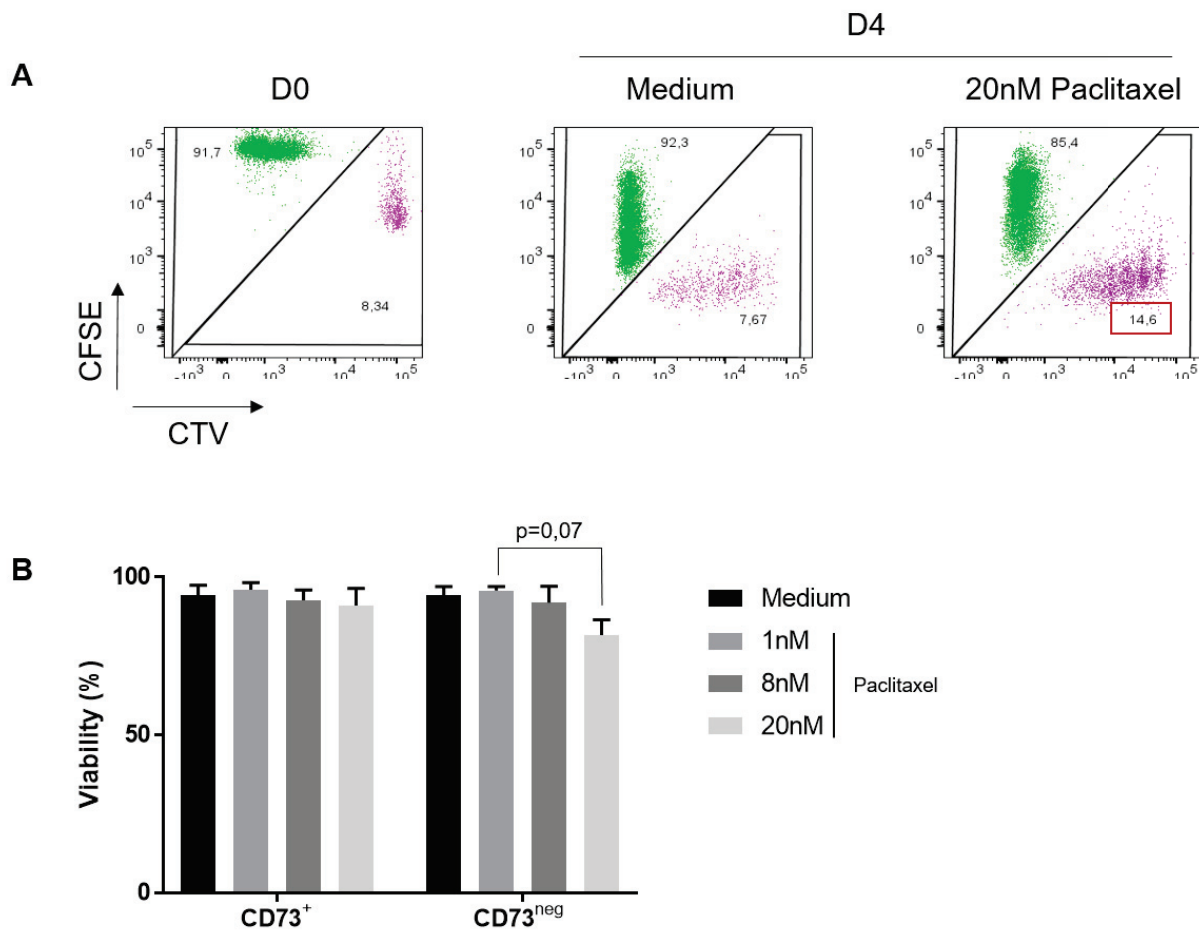


**Supplementary Figure 1: Gating strategy allowing to determine MDR1 expression on CD4 and CD8 T cell subpopulations.** Total PBMC were stained for viability, CD3 CD4 and CD8 before. Total CD4 and total CD8 T cells were analyzed for their CD45RA/CCR7 expression to identify Naive, TCM, TEM and TEMRA populations. On each subset, CD73 expression was assessed. MDR1 expression was assessed either on total subset or based on CD73 expression.



**Supplementary Figure 2: MDR1 expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets.** A-C. Analysis on HD naive, memory and Treg CD4<sup>+</sup> T cells of MDR1 frequency (A), paired MFI of MDR1 (B) and representative facs histograms of MDR1 staining for each population (C). D-E. Analysis on total naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells of MDR1 frequency (D) and MFI (E). F-G. Analysis of MDR1 expression on naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells based on

CD73 expression (F) and MFI (G). H-I. MDR1 expression on total CD8+ T cell subpopulations (H) and based on CD73 expression (I). A, H: ANOVA-1, B: paired t-test, F-G-I: ANOVA-2. D-E: t-test. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .



**Supp Figure 3: CD73<sup>+</sup> T cells better resist to Paclitaxel treatment *in vitro*. A.**

Representative facs plot of sorted CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> T cells respectively stained with CTV and CFSE proliferation dyes before being mixed at a 1:10 ratio and activated *in vitro* for 4 days with expand beads (ratio 1:4) in cRPMI with or without 20nM Paclitaxel. **B.** Viability of CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>neg</sup> T cells in the physiological mix after 4 days' activation in presence of increasing doses of Paclitaxel (1 to 20nM). B: ANOVA-2.

#### **IV. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES : REGULATION DE CD73 DANS LES CELLULES IMMUNES CHEZ L'HOMME**

La régulation de l'expression de l'ecto-nucléotidase CD73 a été largement investiguée dans les cellules épithéliales ou endothéliales pour lesquelles l'expression de CD73 est préservée lorsqu'elles prolifèrent (Niemelä et al., 2004; Sadej and Skladanowski, 2012). Chez l'Homme cependant, peu de littérature existe à ce jour concernant la régulation de cette molécule sur les cellules immunes et plusieurs données semblent indiquer que les mécanismes mis en jeu sont bien différents dans ces cellules. Au cours de ma thèse je me suis intéressée à cette question afin de mieux caractériser la régulation de l'expression de CD73 particulièrement sur les Teff.

Notre observation montre la perte d'expression de CD73 à la surface des lymphocytes LTCD4 ou LTCD8 lorsqu'ils prolifèrent. Des observations similaires ont été décrites sur des LB (Saze et al., 2013). Cette expression semble donc dynamique dans les lymphocytes alors qu'elle est stable sur des cellules épithéliales ou endothéliales en prolifération.

Plusieurs hypothèses de travail ont été émises afin d'investiguer cette question. Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, l'hypoxie est un facteur régulant positivement l'expression de CD73 sur des cellules tumorales (Lu et al., 2013) et endothéliales (Synnestvedt et al., 2002). L'hypoxie est également une caractéristique du contexte inflammatoire dans lequel les lymphocytes sont amenés à proliférer. J'ai donc évalué le rôle de l'hypoxie dans la régulation de CD73 sur les cellules immunes.

J'ai par ailleurs fait l'hypothèse d'un rôle du signal TCR/BCR dans l'induction d'une réduction de la traduction du gène *NT5E*, ceci permettant aussi d'expliquer la spécificité de ce mécanisme sur des populations de lymphocytes exprimant CD73. Par ailleurs, la perte d'expression de CD73 sur les lymphocytes étant associées à leur état activé/de prolifération, j'ai également étudié la répartition des populations de Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> dans les différentes phases du cycle cellulaire.

J'ai également fait l'hypothèse d'une régulation épigénétique spécifique de *NT5E* dans le lignage T dont je présente les premiers résultats ici mais qui nécessitera de plus amples investigations à l'avenir.

## Matériel et Méthode

### Purification de sous populations de LT de sang de donneurs sains

Les cellules mononuclées (PBMC) de sang de donneurs sains obtenu à l'EFS, sont isolées après centrifugation sur gradient de Ficoll (Eurobio). Les LTCD4 mémoires totaux sont ensuite purifiés à partir des PBMC par centrifugation sur gradient de Percoll 51% (GE-Healthcare) suivie d'une sélection négative des LTCD4 mémoires par tri magnétique (Magnisort human memory CD4<sup>+</sup> T cells enrichment kit, Life Technologies). La pureté de cette fraction évaluée par cytométrie en flux (CF) est toujours supérieure à 95%. Les LTCD4 et LTCD8 naïfs (CD45RA<sup>+</sup>) sont purifiés avec un kit de sélection négative des LTCD4 naïfs (Magnisort human naive CD4<sup>+</sup> T cells enrichment kit) et LTCD8 naïfs (Magnisort human naive CD8<sup>+</sup> T cells enrichment kit) avec une pureté toujours supérieure ou égale à 95%.

Les LTCD4 mémoires isolés utilisés pour le tri cellulaire sont marqués avec le cocktail d'anticorps suivants : CD45RA (2H4LDH11LDB9, Beckman Coulter), CD25 (2A3, BD Biosciences) et CD73 (AD2), CD127 (eBioRDR5) et CD39 (eBioA1) (Invitrogen), chacun à une dilution au 1/40<sup>e</sup> et triés par CF (FACS Aria, Becton Dickinson) pour isoler les Teff CD73<sup>+</sup>(CD127<sup>high</sup>CD25<sup>neg/int</sup>CD73<sup>+</sup>CD39<sup>neg</sup>) et CD73<sup>neg</sup>(CD127<sup>high</sup>CD25<sup>neg/int</sup>CD73<sup>neg</sup>CD39<sup>neg</sup>) avec une pureté de chaque sous-population systématiquement supérieure ou égale à 98%. Des prélèvements de tumeurs primaires du sein et d'amygdales sont obtenus respectivement auprès du Centre Léon Bérard et de la Clinique Mutualiste Eugène André après signature par les patients d'un consentement éclairé. Après dilacération mécanique, les pièces opératoires sont soumises à une digestion enzymatique en utilisant un cocktail de DNase et de collagénase I (45min à 37°C sous agitation magnétique) afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène après filtration pour éliminer les agrégats tissulaires résiduels. Du liquide synovial d'articulation de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde au diagnostic a été obtenu au Centre Hospitalier Lyon Sud après signature d'un consentement éclairé des patients (collaboration Dr F. Coury). L'infiltrat immunitaire présent dans le liquide synovial a été analysé après isolation sur gradient de Ficoll.

## **Analyse de l'expression de CD73 au cours de la prolifération cellulaire par dilution CTV**

Les Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> purifiés selon la procédure décrite dans la section précédente sont repris à une concentration de  $10 \cdot 10^6$  cellules/ml dans du PBS 1X contenant le marqueur de prolifération Cell Trace Violet (CTV, dilution 1/1000, Life Technologies) et incubés pendant 20min à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction de marquage est arrêtée par ajout de RPMIc au mix. Les cellules marquées au CTV ( $3 \cdot 10^4$ ) sont cultivées en RPMIc dans des plaques 96 puits à fond rond (Falcon) avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (Life Technologies) à un ratio bille:cellule de 1 :4 pendant 4 jours. En fin d'activation, la prolifération est évaluée par l'analyse de la dilution du marqueur de prolifération CTV par cytométrie de flux (LSR-II, Becton Dickinson). Les surnageants de ces cellules ont été conservés pour quantification de l'activité AMPase de la fraction CD73 soluble (sCD73). Dans certaines expériences,  $3 \cdot 10^4$  cellules collectées après 4 jours de stimulation ont été remises en culture en RPMIc sans signal TCR pendant 48h afin d'évaluer la réexpression de CD73 par CF en condition de repos.

Dans certains cas, des Teff totaux marqués au CTV sont cultivés *in vitro* pendant 7 jours en RPMIc seul (condition contrôle) ou en présence de différents cocktails de cytokines (IL-7+IL-15, IL-7+IL-15+IL-2, IL-7+IL-6+IL-15, IL-7+IL-15+IL-6+TNF $\alpha$ ) décrits pour activer la prolifération homéostatique des LT humains (Geginat et al., 2001).

## **Analyse de l'expression de CD73 après prolifération cellulaire par Western Blot**

Des LTCD8 ou LTCD4 naïfs, ainsi que des Teff CD73<sup>neg</sup> ou CD73<sup>+</sup> ( $2 \cdot 10^6$  cellules) activés ou non pendant 4 jours avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (ratio 1 :4) sont isolés et lysés en tampon RIPA en présence d'inhibiteurs de protéases. Les lysats protéiques obtenus sont bouillis et chargés sur des gels de migration (Mini-PROTEAN® GX™ Precast Gels 5-20%, Biorad). Le transfert est ensuite réalisé sur des membranes Mini PVDF (Biorad) *via* le système Trans-Blot® Turbo™. CD73 est détecté avec l'anticorps monoclonal murin anti-hCD73 (1D7, 1/500, Abcam). CD39 est détecté avec l'anticorps monoclonal murin anti-hCD39 (bu61, 1/200, Santa Cruz). L'expression de CD73 et CD39 est ensuite révélée avec un anticorps secondaire chèvre-anti-souris couplé à HRP (12-349, 1/5000, Upstate). Les membranes sont ensuite

révélées avec le réactif Luminata Crescendo (Millipore) et quantifiées sur un appareil Chemidocs™ (Biorad).

### **PCR méthylation spécifique**

La méthylation de l'îlot CpG du gène *NT5E* est analysée par PCR méthylation spécifique (MSP). L'ADN génomique total extrait de populations LTCD4 ou de lignées tumorales mammaires contrôles (MDA-MB-231 et T47D) (NucleoSpin® Tissue, Macherey Nagel) est ensuite bisulfite (Epitect Bisulfite, Qiagen) afin que les cytosines non méthylées soient modifiées en uraciles. L'ADN bisulfite est ensuite utilisé comme matrice dans un mix de PCR (TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA, Clontech) avec des primers spécifiques de l'îlot CpG sous sa forme méthylée (M) ou déméthylée (U).

M forward primer 5'- TATTTTATGAACGTTTTGCGTTACG-3'

M reverse primer 5'-CTAAACTTACCACACTCTACCATCCG-3'

U forward primer 5'-ATTTTATGAATGTTTTGTGTTATGA-3'

U reverse primer 5'-AACTTACCACACTCTACCATCCACT-3'.

La PCR est réalisée avec le programme suivant : 95°C 10min, 95° 30s/54° 30s/72° 40s pendant 40 cycles et 72° 7min. Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 2% pour migration avant révélation sur un Transilluminator (FisherScientific).

### **Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux**

Des Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> triés sont cultivés *in vitro* pendant 72h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) en RPMIc en présence de billes anti-CD3/anti-CD28 (3.10<sup>4</sup> cellules/puits, ratio 1 :4). A 70h de culture, l'EdU (Click IT EdU Alexa Fluor 488 kit, Life Technologies) est ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 10µM. Après 2h d'incorporation de l'EdU à 37°C, les cellules sont collectées et l'expression de CD73 est analysée en membrane (AD2, Life Technologies). Un marquage de viabilité (Zombie NIR, Biolegend) est également réalisé. Un double marquage EdU Alexa Fluor 488/ FxCycle Violet stain (Life Technologies) est ensuite réalisé sur les cellules pour étudier les différentes les phases du cycle cellulaire selon les instructions du fournisseur. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie de flux (LSR-II).

## Test d'hypoxie chimique

Pour mimer des conditions d'hypoxie sur des Teff, nous avons utilisé du DMOG, un analogue chimique de la HIF-prolyl-hydroxylase, qui stabilise HIF-1 $\alpha$  en condition de normoxie et qui a été précédemment utilisé pour induire l'hypoxie sur des LT (Palazón et al., 2012). Le niveau d'hypoxie est analysé en évaluant l'augmentation d'expression membranaire du transporteur du glucose GLUT1 (Cretenet et al., 2016) en utilisant un de ses ligands, fusionné à la eGFP (Metafora Biosystem). Brièvement, les cellules ( $5.10^4$ /puits) sont cultivées pendant 48h en présence de billes anti-CD3/anti-CD28 (ratio 1 :4), en milieu RPMIc seul ou en présence de DMOG (0.1 ou 0.2 mM). Après collecte des cellules, le marquage extracellulaire pour GLUT-1 et CD73 est réalisé avant analyse par cytométrie de flux (LSR-II).

## NT5E mRNA qPCR analyses

Des Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> triés sont soit congelés ( $5.10^5$  cellules) directement en tampon de lyse ARN à -80°C (JO), soit cultivés en RPMIc ( $3.10^4$ /puits) en présence de billes anti-CD3 anti-CD28 (ratio 1 :4) pendant 24h, 48h, 72h ou 96h. A la fin du temps de culture, les cellules sont récoltées, lavées et congelées ( $5.10^5$  cellules/condition) à -80°C en tampon de lyse ARN avant extraction d'ARN.

Les ARN totaux des cellules triées et activées ou non sont extraits en utilisant le kit NucleoSpin RNA isolation (Macherey Nagel) et traités avec la rDNase pour éliminer toute contamination par de l'ADN génomique. Les ADNc sont ensuite synthétisés grâce au kit iScript Adv. cDNA (BioRad) et l'expression des gènes d'intérêt est évaluée grâce à l'appareil CFX96 Real-Time PCR Detection system (BioRad) dans le mix SYBR green Supermix (BioRad). Les données sont normalisées par rapport à l'expression du gène de ménage RPLPO choisi pour sa stabilité d'expression dans des lymphocytes activés. Les primers utilisés sont les suivants (5'-3') : *NT5E* : F-TCTTCTAAACAGCAGCATTCC, R-CATTTTCATCCGTGTGTCTCAG ; *RPLPO* : F-GCAGCATCTACAACCCTGAAG, R-CACTGGCAACATTGCGGAC. Le programme PCR utilisé est le suivant : 95°C 5 min, puis 40 cycles à 95°C 10 s, 60°C 30 s et 72°C 15 s.

La quantification d'expression de *NT5E* est réalisée en comparaison à l'expression du gène RPLPO en utilisant la méthode de 'delta-delta Ct' pour comparer l'expression relative de ces gènes dans les différentes conditions d'activation.



## Résultats

### **CD73 est perdu au niveau protéique et messenger dans des Teff CD73<sup>+</sup> en prolifération**

Nous avons pu montrer par cytométrie en flux (**Figure 1A**) et Western Blot (**Figure 1B et 1C**) que des LT CD73<sup>+</sup> (Teff CD73<sup>+</sup> ou LTCD8 naïfs) perdent l'expression de CD73 en proliférant. L'analyse de l'expression du gène *NT5E* par RT-qPCR sur des Teff CD73<sup>+</sup> a permis de mettre en évidence que la forte diminution de l'expression de CD73 dès 24h d'activation de ces cellules (**Figure 1D**). De manière intéressante, dans des contextes physiologiques ou pathologiques caractérisés par une activation des lymphocytes, CD73 n'est jamais retrouvé co-exprimé avec le marqueur de prolifération KI67 (**Figure 2**), ce qui renforce nos observations *in vitro* montrant sur LT purifiées que les cellules qui prolifèrent n'expriment pas CD73.

### **La perte d'expression de CD73 sur les Teff CD73<sup>+</sup> est réversible et n'est pas induite par l'activation du TCR**

Notre hypothèse est que cette perte d'expression est nécessaire *in vivo* à la prolifération des Teff CD73<sup>+</sup> pour éviter la production d'Ado qui inhibe leur prolifération. Cependant, il est important de noter que cette perte d'expression est transitoire puisque lorsque les Teff CD73<sup>+</sup> activés pendant 4 jours *in vitro* sont remis en condition de repos (sans stimulation TCR pendant 48h) une ré acquisition partielle de l'expression de CD73 est observée (**Figure 3A**).

Puisque l'expression de CD73 est perdue avec la prolifération de façon spécifique suite à une activation BCR ou TCR dans les lymphocytes B (Saze et al., 2013) et T (**Figure 1D**) respectivement, nous avons évalué la modulation de l'expression de CD73 sur des Teff CD73<sup>+</sup> dans des conditions de prolifération homéostatique induite par un cocktail de cytokines. Dans ce cas précis, le signal de prolifération est en effet indépendant de l'activation du TCR. Nous avons ainsi pu montrer que ces conditions induisent aussi la perte d'expression de CD73 sur les cellules en prolifération (**Figure 3B**). Ceci suggère fortement que c'est l'entrée en cycle qui est à l'origine de cette perte d'expression membranaire, écartant de fait un rôle spécifique de la signalisation TCR.

## **Les Teff CD73<sup>+</sup> qui entrent en cycle s'arrêtent en phase G<sub>2</sub>/M ce qui pourrait être important pour un arrêt de l'expression de CD73 nécessaire à leur prolifération**

L'analyse de la prolifération *via* la dilution du CTV montre une diminution d'expression de CD73 dès le premier cycle de prolifération. Une étude plus détaillée de la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire montre que les Teff CD73<sup>+</sup> sont partiellement bloqués en phase G<sub>2</sub>/M (**Figure 4A**) ce qui suggère un retard compatible avec un arrêt du programme transcriptionnel pour permettre la régulation de l'expression de *NT5E*. Lorsque l'on analyse indépendamment le cycle cellulaire sur les différents pics de prolifération de Teff CD73<sup>neg</sup> ou CD73<sup>+</sup> activés pendant 72h, on observe une augmentation de la fréquence de cellules en phase G<sub>2</sub>/M au sein des cellules exprimant encore CD73 en membrane après la 1<sup>e</sup> ou 2<sup>e</sup> division, alors que des Teff « ex-CD73<sup>+</sup> », i.e. des Teff CD73<sup>+</sup> activés ayant perdu l'expression membranaire de CD73, se comportent de façon identique aux Teff CD73<sup>neg</sup> activés (**Figure 4B**). Ces données suggèrent que la diminution graduelle de CD73 membranaire observée au cours des cycles de prolifération des Teff CD73<sup>+</sup> est le reflet d'une répartition de la protéine à la membrane des cellules filles qui n'est en revanche plus renouvelée du fait d'un arrêt de la transcription de *NT5E* lorsque le programme de prolifération est enclenché. Dans la littérature il a été montré que CD73 peut être clivé au niveau de son ancre GPI par la phospholipase C qui est activée dans les lymphocytes en prolifération (Airas et al., 1997; Mustelin et al., 1990). L'analyse de l'activité AMPase de CD73 dans les surnageants de culture par dosage de l'hydrolyse d'AMP[3H] par spectrométrie de masse n'a cependant pas permis de mettre en évidence un clivage de la protéine présente en surface. Le test utilisé est initialement utilisé pour doser l'activité AMPase de sCD73 dans des plasmas où il est présent en plus grande quantité. Il est donc possible que le test mis en place pour ces analyses ne soit pas assez sensible pour mettre en évidence sCD73 présent dans les surnageants de cellules activées.

## **L'expression de CD73 dans les LT n'est pas régulée par une méthylation du promoteur du gène *NT5E***

Le fait que les LTCD4 naïfs n'expriment que très peu CD73 et que cette molécule est exprimée par des Teff ayant un phénotype particulier (Gourdin et al., 2018), suggèrent que l'expression de CD73 est acquise lors du processus de polarisation en Th. Ce

processus a été largement décrypté et il est établi que des modifications épigénétiques profondes sont entre autres nécessaires à la mise en place de programmes traductionnels spécifiques (Wilson et al., 2009). Dans des cellules tumorales de mélanome et de sein notamment, l'expression de CD73 est régulée par une méthylation du promoteur de *NT5E*, un profil déméthylé étant associé à une forte expression de CD73 et un mauvais pronostic pour les patientes (Lo Nigro et al., 2012; Wang et al., 2012). Nous avons pu montrer, en utilisant la technique de PCR méthylation spécifique, que dans les LT, l'expression de *NT5E* est indépendante d'un mécanisme de méthylation de son promoteur (**Figure 5**). Ces données suggèrent donc que d'autres mécanismes de régulation de l'expression de CD73 aux niveaux transcriptionnel et traductionnel sont mis en jeu lors de la différenciation des LTCD4 naïfs en Teff. Il serait intéressant d'étendre cette investigation à d'autres populations immunes afin de déterminer si ce processus est propre aux LT CD4<sup>+</sup> ou est plus largement observée dans le compartiment immunitaire.

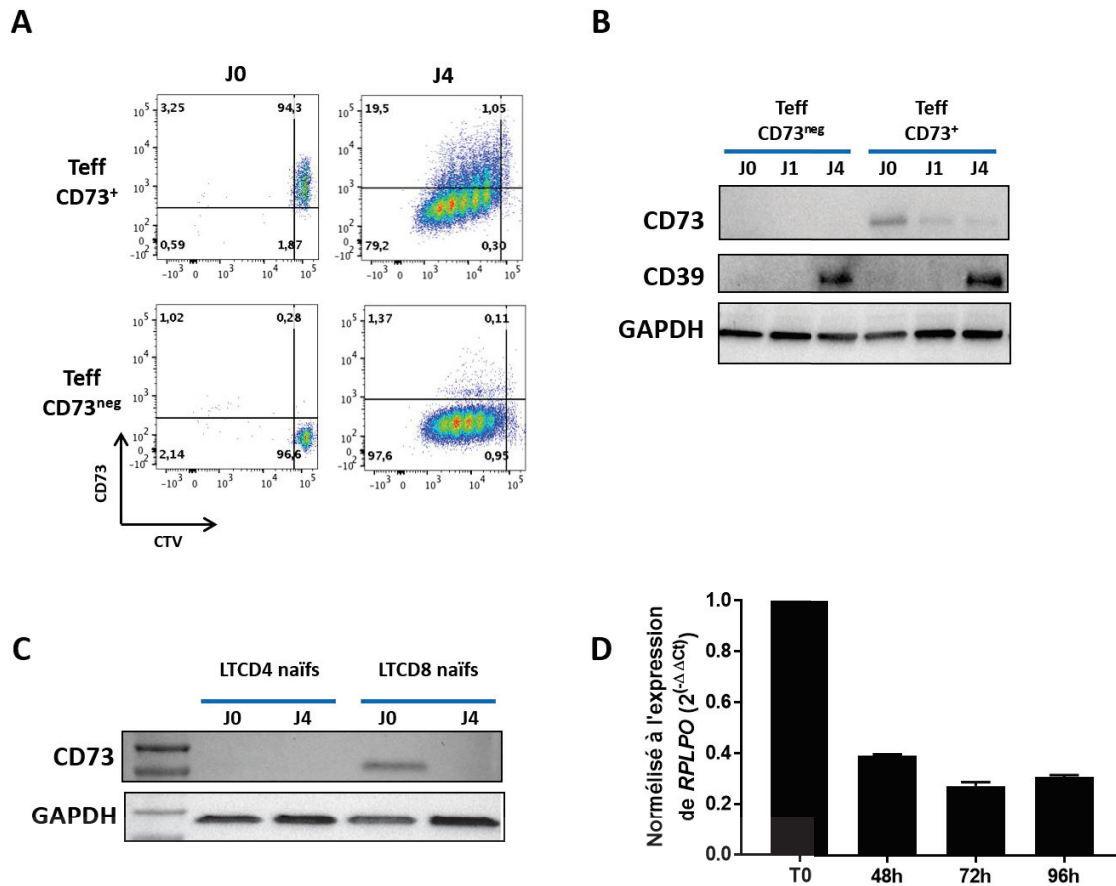
### **L'hypoxie induit une augmentation d'expression de CD73 sur des Teff actifs**

A l'instar de ce qui a été décrit dans des cellules épithéliales ou endothéliales (Lu et al., 2013; Synnestvedt et al., 2002), l'hypoxie semble capable d'augmenter l'expression de CD73 sur les cellules qui l'expriment. En exposant les Teff *in vitro* à du DMOG, un analogue de la HIF-prolyl-hydroxylase, qui stabilise HIF-1 $\alpha$  en condition de normoxie, j'ai pu mettre en évidence un enrichissement en cellules CD73<sup>+</sup> parmi des Teff GLUT1<sup>hi</sup> (**Figure 6**). GLUT1 est un transporteur membranaire dont l'expression est augmentée sur des cellules en hypoxie (Cretenet et al., 2016). En présence de DMOG, ces cellules GLUT1<sup>hi</sup> présentent une augmentation de la MFI de CD73 par rapport aux cellules GLUT1<sup>lo</sup> et à la condition contrôle en milieu complet. Cela indique un enrichissement en Teff CD73<sup>+</sup> dans la fraction GLUT1<sup>hi</sup> qui marque la présence de cellules en hypoxie.

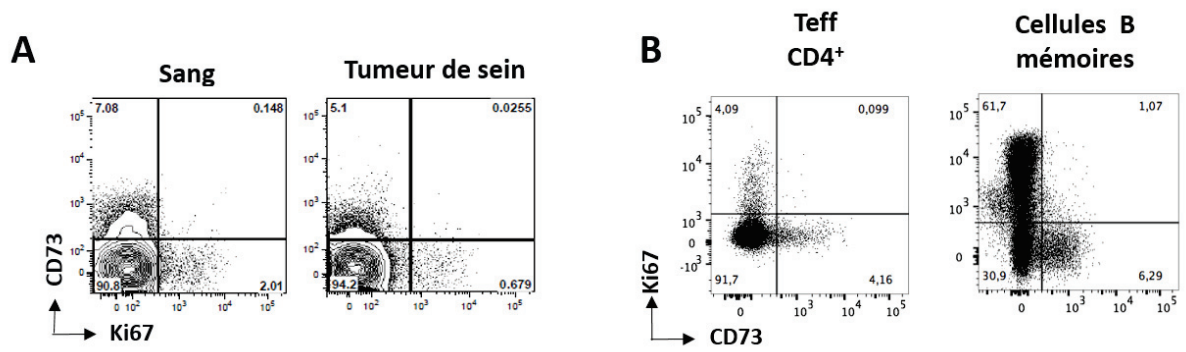
L'ensemble de ces résultats participent à suggérer l'existence d'une régulation différente de l'expression de CD73 sur les LT par rapport aux cellules épithéliales ou endothéliales. Ils suggèrent également une régulation fine de CD73 sur les LTCD4 lors de leur prolifération. La nature du signal initiant cette prolifération (TCR-dépendante, prolifération homéostatique) ne semble pas intervenir dans cette régulation.

Cependant l'activation des Teff CD73<sup>+</sup> pourrait faire intervenir un point de restriction du cycle cellulaire au niveau de la phase G2/M. Notre hypothèse est que cet arrêt permet de réduire fortement la transcription du gène *NT5E* et à terme l'expression membranaire de CD73 pour protéger les cellules en prolifération de l'effet immunosuppresseur de l'Ado produit par l'activité enzymatique de CD73. La réversibilité de cette inhibition d'expression, observée en l'absence de signal de prolifération, permet de restaurer une régulation de cette population une fois qu'elles ont proliféré. Cet aspect dynamique est notamment intéressant à explorer dans le cas de pathologies où une modulation de l'expression de CD73 pourrait être envisagée comme cible thérapeutique.

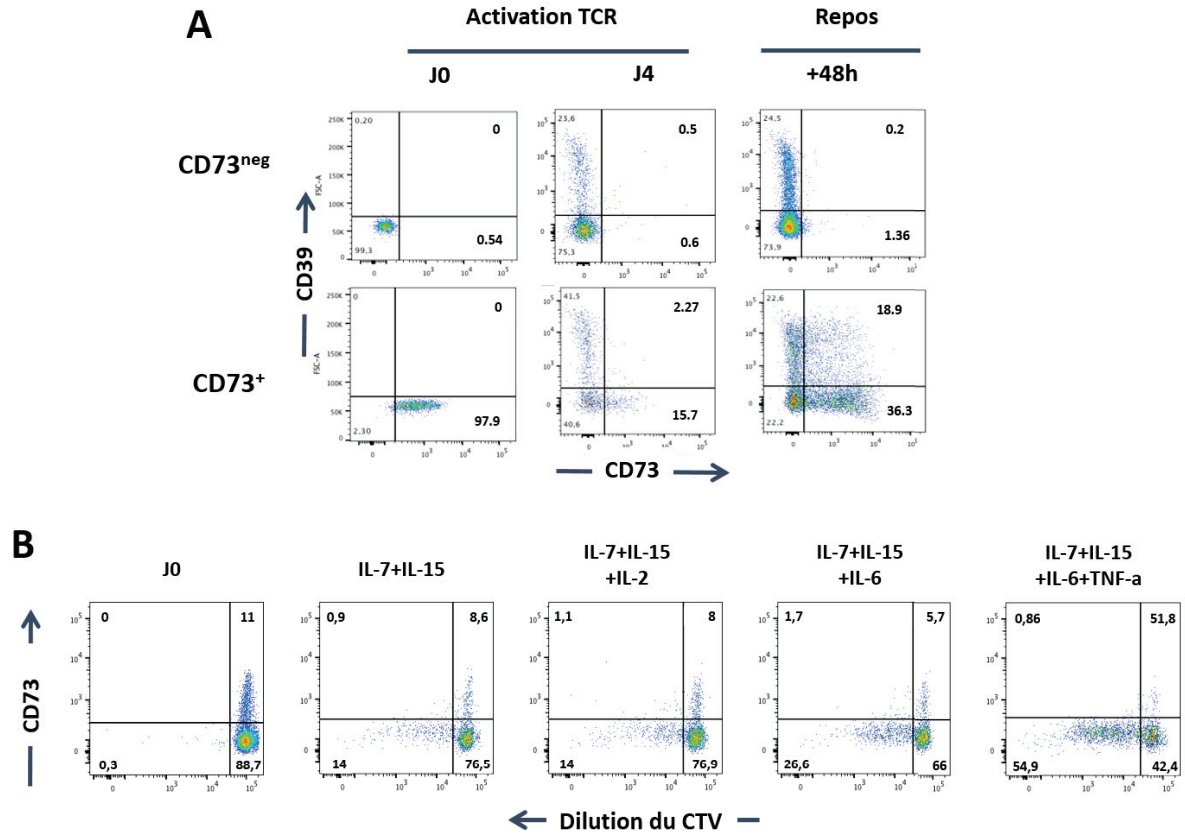
## Figures associées



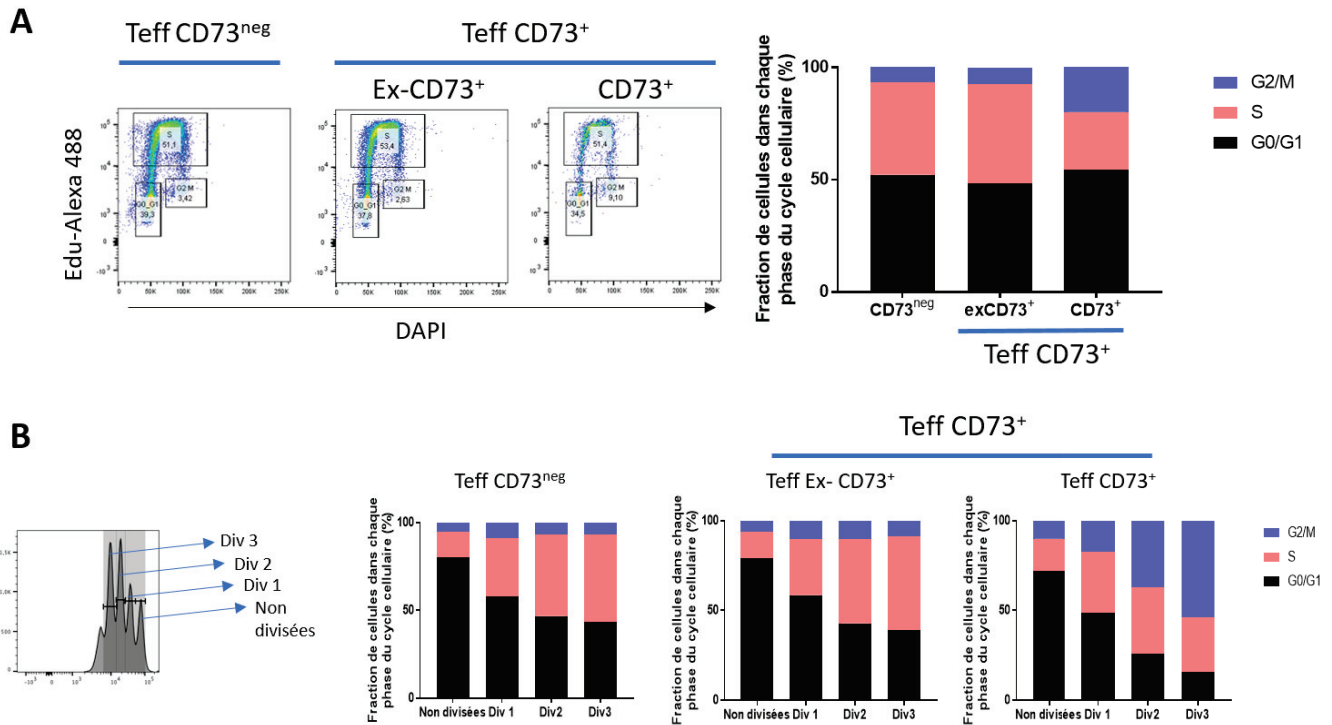
**Figure 1 : L'expression de CD73 est perdue au niveau protéique et transcriptionnel après prolifération induite par un signal TCR. A-** CD73 est perdu sur des Teff CD73<sup>+</sup> en prolifération. Cette perte d'expression est graduelle au cours des divisions (dilutions CTV successives). **B-** L'expression de CD73 et CD39 sur des Teff CD73<sup>neg</sup> et CD73<sup>+</sup> avant activation et après 1 ou 4 jours d'activation avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (ratio 1 :4) confirme une perte d'expression de CD73 au profit d'une augmentation de l'expression de CD39. **C-** Expression de CD73 sur des LTCD4 et LTCD8 naïfs avant (J0) ou après (J4) activation TCR avec des billes d'activation (ratio 1 :4). Pour **B** et **C** GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. **D-** L'analyse par RT-qPCR des ARN extraits de Teffs CD73<sup>neg</sup> et CD73<sup>+</sup> triés et activés avec des billes anti-CD3/anti-CD28 (ratio 1 :4) pendant différents temps de culture (0h, 48h, 72h, 96h) a permis d'établir une diminution d'expression de *NT5E* dès 48h d'activation. Les résultats sont calculés selon la méthode du  $\Delta\Delta C_t$  et sont normalisés par rapport à l'expression du gène *RPLPO*.



**Figure 2 : CD73 n'est pas co-exprimée avec Ki67 sur des Teff CD4<sup>+</sup> *ex vivo*.** **A-** Evaluation de l'expression de CD73 et Ki67 sur des Teff CD4<sup>+</sup> de sang ou de tumeur primaire de patiente atteinte de cancer du sein. **B-** Evaluation de l'expression de CD73 et Ki67 sur des Teff ou sur des lymphocytes B mémoires dans du tissu d'amygdale.

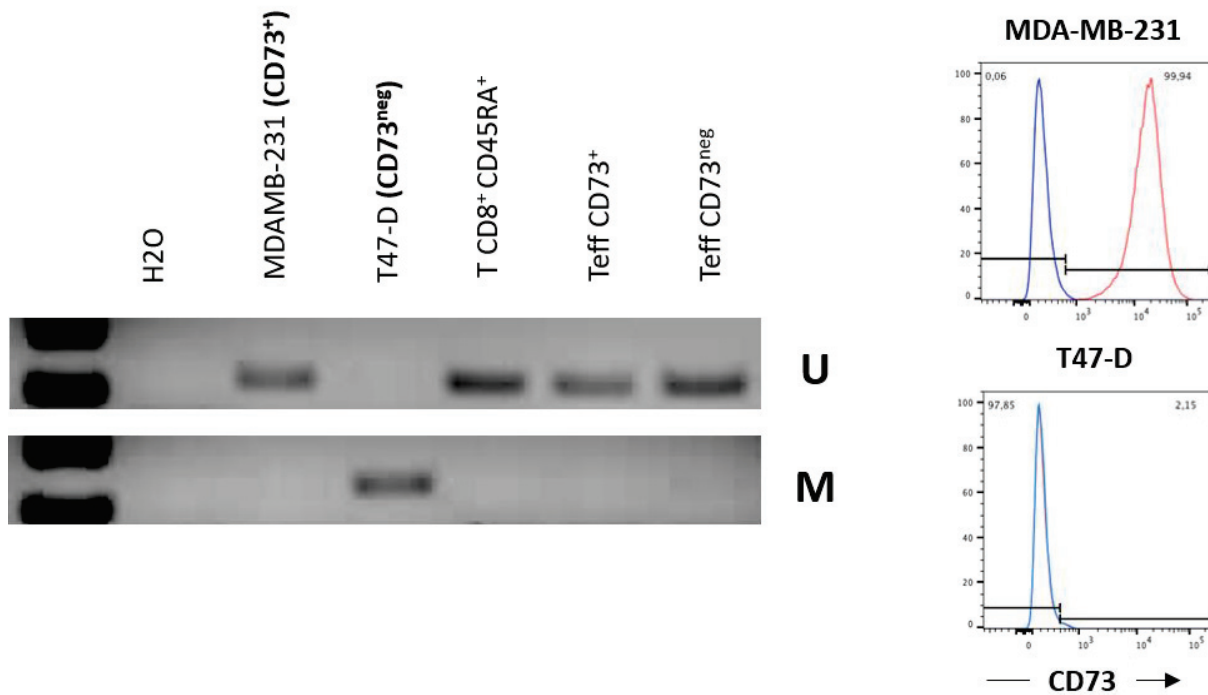


**Figure 3 : L'expression de CD73 sur les Teff est perdue après prolifération induite par activation du TCR ou par un cocktail de cytokines mais est restaurée en condition de repos** **A-** La culture de Teff CD73<sup>neg</sup> et CD73<sup>+</sup> pendant 4 jours en présence de billes d'activation montre une perte importante de l'expression de CD73 qui s'accompagne d'une activation de l'expression de CD39. L'expression de CD73 est cependant partiellement restaurée sur des Teff placés en condition de repos après 4 jours d'activation. **B-** La culture de LTCD4 mémoires totaux, comportant 11% de Teff CD73<sup>+</sup> initialement, avec différents cocktails de cytokines pendant 7 jours conduit également à une perte d'expression de CD73 sur les cellules en prolifération (CTV<sup>low</sup>).

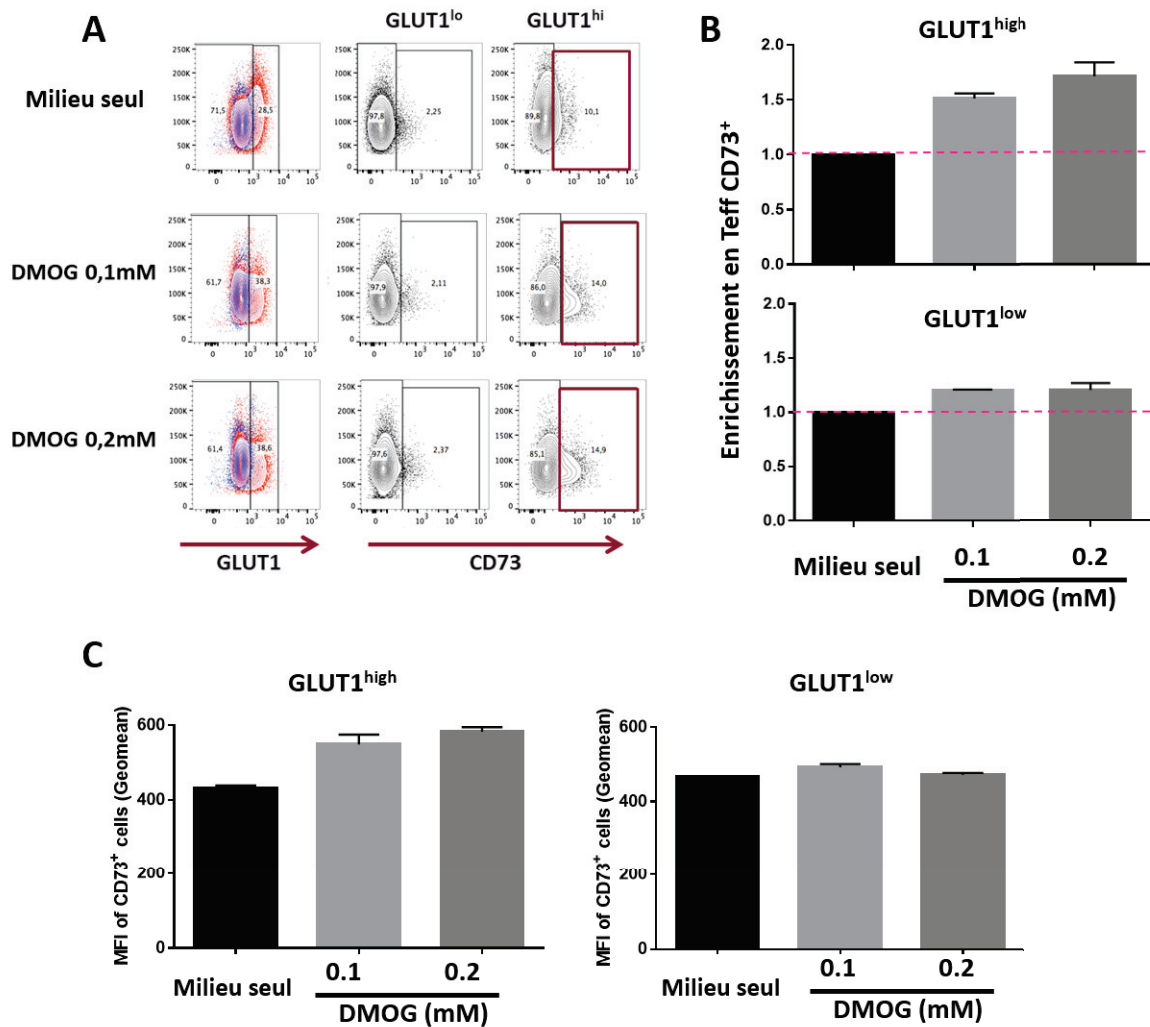


**Figure 4 : L'analyse du cycle cellulaire sur des Teff CD73<sup>neg</sup> et CD73<sup>+</sup> activés 72h montre une rétention des Teff CD73<sup>+</sup> en phase G2/M.** **A-** Analyse représentative du cycle cellulaire sur des Teff CD73<sup>neg</sup> et CD73<sup>+</sup> après 72h de culture en présence de billes anti-CD3/anti-CD28 (ratio 1 :4) (gauche) et résumé de la répartition de chaque population parmi les différentes phases du cycle (droite). **B-** Analyse similaire réalisées après 72h de culture de Teff CD73<sup>neg</sup> et CD73<sup>+</sup> marqués au CTY avant prolifération. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est analysée pour chaque division cellulaire.





**Figure 5 : Contrairement à des cellules tumorales, toutes les populations de LT quel que soit leur statut CD73 ont un îlot CpG déméthylé au niveau du promoteur du gène *NT5E*. L'analyse de la forme déméthylée (U) ou méthylée (M) de l'îlot CpG du promoteur de *NT5E* a été réalisée sur de l'ADN génomique traité au bisulfite de lignées tumorales mammaires (MDA-MB-231 (CD73<sup>+</sup>) et T47-D (CD73<sup>neg</sup>) ou de population de LT purifiés exprimant ou non CD73 (LTCD8 naïfs CD73<sup>+</sup>, Teff CD73<sup>neg</sup> et Teff CD73<sup>+</sup>). L'expression protéique de CD73 évaluée par cytométrie en flux pour les deux lignées tumorales utilisées comme contrôles est représentée à droite de la figure.**



**Figure 6 : L'hypoxie chimique induite par DMOG augmente le pourcentage de cellules CD73<sup>+</sup> parmi le contingent hypoxique (GLUT-1<sup>high</sup>).** A- Figure représentative de l'expression de GLUT-1 sur Teff totaux ainsi que de CD73 parmi les contingents de Teff GLUT-1<sup>high</sup> et GLUT-1<sup>low</sup> analysés par cytométrie en flux après culture en milieu complet avec ou sans ajout de DMOG (0,1 ou 0,2 mM). B- Données cumulées sur l'enrichissement en cellules CD73<sup>+</sup> parmi les populations GLUT-1<sup>high</sup> et GLUT-1<sup>low</sup>. C- Données cumulées sur la moyenne d'intensité de fluorescence de CD73 sur les populations GLUT-1<sup>high</sup> et GLUT-1<sup>low</sup> (n=2).

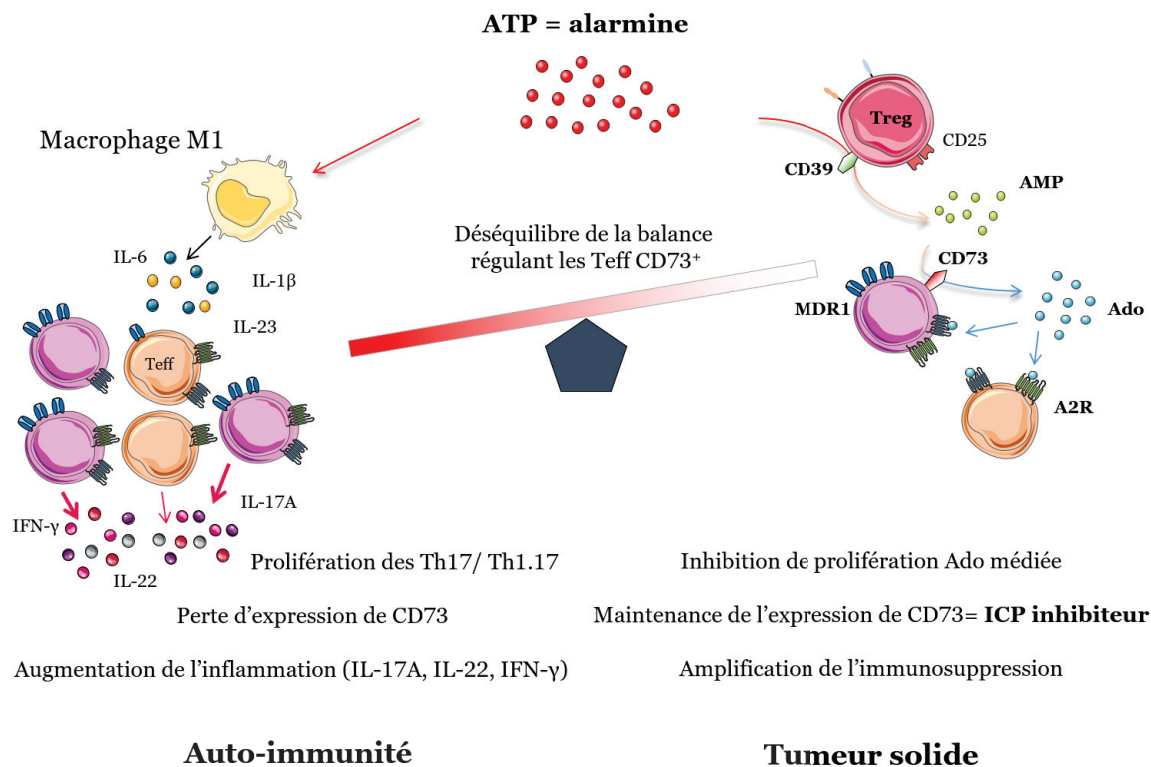


## DISCUSSION

---

Les travaux que j'ai menés au cours de ma thèse ont permis de mieux comprendre les fonctions de la population de Teff CD73<sup>+</sup> qui présente des propriétés singulières et dont la modulation peut avoir un impact majeur en contexte pathologique. Le profil très pro-inflammatoire à dominante Th1.17 et Th17 qu'elle présente, ainsi que sa forte expression du transporteur membranaire MDR1 lui confèrent un atout certain en contexte tumoral où elle pourrait contribuer efficacement à la réponse anti-tumorale à condition de neutraliser sa capacité à générer de l'Ado. CD73 peut en effet être considérée comme un point de contrôle immunitaire pour cette population du fait du rôle immunosuppresseur d'Ado produite de façon autocrine. Si elle apparaît potentiellement bénéfique en contexte tumoral, cette population pourrait en revanche avoir un rôle plutôt délétère dans les pathologies auto-immunes. L'inflammation et l'activation chronique de ces Teff en contexte auto-immun pourraient en effet favoriser leur prolifération et donc diminuer l'expression de CD73, levant tout frein à leur prolifération.

Les données sur la dynamique d'expression de CD73 et la modulation de la fonction des Teff CD73<sup>+</sup>, accumulées dans les contextes pathologiques d'hyper activation des populations T (auto-immunité) ou au contraire de leur inhibition (tumeur), sont résumées sur le schéma suivant.



Je vais maintenant évoquer les points qu'il me paraît important de discuter pour mettre en perspective les résultats obtenus et proposer des pistes de réflexion pour des travaux à venir.

### **IMPORTANCE RELATIVE DE LA PRODUCTION D'ADO PAR LES TEFF CD73<sup>+</sup> EN CONTEXTE TUMORAL**

Nous avons pu montrer que la population de Teff CD73<sup>+</sup> est capable de produire de l'Ado à partir d'ATP extracellulaire en coopération avec des Treg CD39<sup>+</sup>, qui assurent la première étape de la cascade de dégradation de l'ATP extracellulaire en AMP (*cf. Résultats-I*). Il apparaît cependant important de nuancer l'importance relative de la production d'Ado par cette population dans le microenvironnement tumoral, les cellules tumorales étant également capables d'en produire. Dans le contexte du cancer du sein qui est notre principale pathologie d'étude, les données d'expression de CD73 par les cellules tumorales montrent un patron d'expression très hétérogène. L'analyse des données d'expression génique de plus de 6000 cas de cancer du sein a permis de montrer que la forte expression de *NT5E* est associée à un mauvais pronostic dans le

sous-type moléculaire triple négatif (TNBT, ER<sup>neg</sup>, PgR<sup>neg</sup>, Her2/neu<sup>neg</sup>) (Loi et al., 2013). Toutefois, ces résultats sont basés sur des analyses transcriptomiques de tumeurs totales et il apparaît important de vérifier cette expression au niveau protéique pour valider ce patron d'expression restreint aux TNBT mais aussi de définir si d'autres cellules du microenvironnement tumoral l'expriment et pourraient jouer un rôle dans la production d'Ado immunosuppresseur. En effet, l'analyse de l'expression de la protéine CD73 par immuno-histochimie (IHC) au sein de l'équipe montre que l'expression de CD73 est très hétérogène au sein des TNBT (n>500 cas) et n'est retrouvée sur les cellules tumorales que dans une faible fraction des tumeurs analysées. CD73 est par contre largement exprimée par les cellules endothéliales, les fibroblastes associés aux tumeurs et, dans certaines tumeurs, par les cellules immunes infiltrantes (données obtenues dans le cadre du consortium européen TumAdoR). Par ailleurs l'étude récente d'une cohorte rétrospective de 122 cas de TNBT, montre que les patientes présentant une faible expression tumorale de CD73 combinée à un fort infiltrat en cellules immunitaires (CD45<sup>+</sup>) ont une meilleure survie sans progression (Buisseret et al., 2018). Dans d'autres pathologies tumorales, en particulier chez les patients atteints de mélanome, l'expression de *NT5E* par les cellules tumorales est associée à un fort potentiel métastatique (Monteiro et al., 2018; Wang et al., 2012). Récemment, l'expression de *NT5E* a été associée à une signature « MITF<sup>low</sup> » invasive dans des lignées tumorales de mélanome (Reinhardt et al., 2017). L'augmentation d'expression de CD73 dans ce sous-type résulte de mutations activatrices de MAPK qui, *via* la fixation du complexe c-Jun/AP-1 sur son promoteur, induisent la transcription de *NT5E* en coopération avec la signalisation inflammatoire médiée par le TNF- $\alpha$ . De nombreuses études associent CD73 au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui joue un rôle majeur dans la capacité de la tumeur primaire à métastaser (Turcotte et al., 2015, 2017). En effet, dans les cancers sévères de haut grade de l'ovaire, la plus forte expression de *NT5E* est associée au sous-type moléculaire C1 / stromal et est positivement corrélée avec une signature de gènes de l'EMT (Lupia et al., 2018; Turcotte et al., 2015). Dans les cancers du sein Her2/neu amplifiés, l'expression de *NT5E* est corrélée positivement avec une signature de gènes associés à l'EMT et à l'hypoxie (Turcotte et al., 2017). De plus, l'analyse en IHC par l'équipe d'une petite série (n=21) de carcino-sarcomes du sein, une entité rare au sein des TNBT constituée d'un contingent de cellules épithéliales et de cellules ayant subi l'EMT (composante sarcomatoïde), montre une expression plus forte de CD73 sur la

composante sarcomatoïde (données obtenues dans le cadre du consortium européen TumAdoR). Enfin, dans les cancers du poumon non à petites cellules, au niveau du front d'invasion, les cellules tumorales ont également un aspect fibroblastique et expriment plus fortement CD73. Données obtenues dans le cadre du consortium européen Tumador sur des études de cohortes de cancers du pancréas et de la thyroïde montrent également une forte expression de CD73 au front d'invasion de la zone tumorale. Ces études suggèrent donc un lien entre l'expression de CD73 et l'agressivité tumorale en plus de sa fonction enzymatique immunosuppressive.

CD73 a été suggérée comme un biomarqueur tumoral à prendre en compte dans la prise de décision pour traiter les patients par immunothérapie de type anti PD-1 (Beavis et al., 2015). Cependant, du fait de son expression par de nombreux composants du microenvironnement tumoral (cellules tumorales, cellules endothéliales, stroma et cellules immunes) qui peuvent tous participer à la dégradation d'AMP en Ado, il apparaît nécessaire d'établir un score d'expression composite (score H) qui prend en compte les niveaux et pourcentages d'expression de CD73 au niveau des cellules tumorales mais aussi du stroma et/ou de l'infiltrat immunitaire pour évaluer le rôle de CD73 sur le pronostic.

## **QUEL MECANISME EST RESPONSABLE DE L'ARRÊT DANS LE CYCLE CELLULAIRE CONSTATE SUR DES TEFF CD73<sup>+</sup> EN CONDITION DE PROLIFÉRATION ?**

Du fait de l'action autocrine inhibitrice d'Ado sur les Teff CD73<sup>+</sup>, (*cf. Résultats-I*) il apparaît nécessaire qu'elles perdent l'expression de CD73 lorsqu'elles sont activées en présence d'AMP extracellulaire, pour lever ce frein à leur prolifération et leur production de cytokines. Cette perte d'expression est observée aussi bien dans des expériences *in vitro* sur des Teff CD73<sup>+</sup> activés par un signal TCR ou un cocktail de cytokines (*cf. Résultats-IV*) que lors de l'analyse de Teff activés *in vivo* dans des organes lymphoïdes secondaires (amygdale) ou du liquide synovial d'articulations inflammées, (*cf. Résultats-II*). L'étude détaillée de la répartition des Teff CD73<sup>+</sup> au sein des phases du cycle cellulaire nous a permis d'identifier leur accumulation en phase G2/M à chaque pic de prolifération (*cf. Résultats-IV*). Ceci semble en cohérence avec l'hypothèse d'un arrêt nécessaire de la transcription du gène *NT5E*

pour permettre la prolifération des cellules. Cet arrêt de transcription pourrait en effet nécessiter des ajustements, coûteux en terme énergétique pour la cellule, qui justifieraient ce blocage. Nous n'avons pas encore identifié le mécanisme pouvant expliquer cet arrêt en phase G2/M qui est spécifiquement observé sur les Teff CD73<sup>+</sup> activés mais l'une des pistes d'étude envisagée est une variation de l'expression de CDC25B. Dans les données d'analyse transcriptome comparant les Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> activés, cet élément régulateur du cycle cellulaire est en effet plus faiblement exprimé dans les Teff CD73<sup>+</sup>. Cette phosphatase a pour rôle d'activer la cycline dépendante des kinases CDC2 en hydrolysant deux groupes phosphate qui lui sont associés (Lammer et al., 1998). Cette action de CDC25B est nécessaire à l'entrée en mitose de la cellule et cette protéine navigue entre le noyau en phase G1 et M et le cytoplasme en phase S et G2 (Lindqvist et al., 2004). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que cette phosphatase pourrait être moins abondante et/ou retenue dans le noyau des Teff CD73<sup>+</sup> en phase S, ce qui retarderait son retour dans le cytoplasme pour finaliser la phase G2. Une quantification par ImageStream-X<sup>®</sup> de la présence de CDC25B dans des Teff CD73<sup>+</sup> (en les comparant aux CD73<sup>neg</sup>) ainsi qu'une étude de sa localisation subcellulaire pourrait permettre de mieux comprendre la dynamique d'expression de CD73 dans les lymphocytes T au cours du cycle cellulaire chez l'Homme.

## **L'EXPRESSION DE CD73 SUR LES LT CHEZ L'HOMME SEMBLE S'INSCRIRE DANS UN PATRON TRANSCRIPTIONNEL ET FONCTIONNEL QUI DEPASSE LE PARADIGME CD4/CD8**

Au sein des populations de LT, nous avons pu mettre en évidence dans les **Résultats-I & III** que l'expression de CD73 est bien distincte selon que l'on considère les LTCD4 ou les LTCD8.

Parmi les LTCD8 (*cf. Résultats-III*), CD73 est fortement exprimée par les cellules naïves et cette expression décroît avec la différenciation (T<sub>CM</sub>>T<sub>EM</sub>>T<sub>EMRA</sub>). La forte expression de CD73 sur le pool de LTCD8 naïfs pourrait constituer un mécanisme de préservation contre des phénomènes d'auto-réactivité. La production autocrine d'Ado médiée par CD73 sur ces LTCD8 naïfs pourrait notamment jouer un rôle protecteur. En effet le groupe de Joël Linden a démontré l'importance de la signalisation



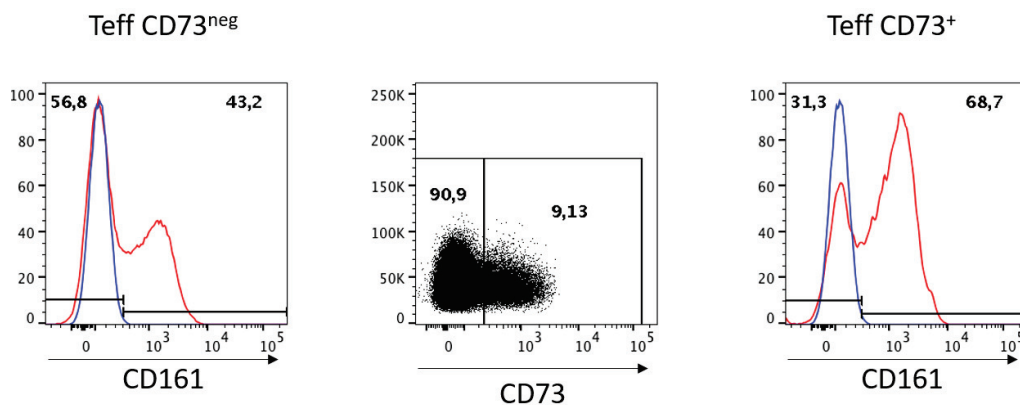
A2AR/Ado pour maintenir un pool de LT naïfs en périphérie et d'autre part pour empêcher le développement et la prolifération de clones auto-réactifs dirigés contre des Ag de faible affinité (Cekic and Linden, 2016; Cekic et al., 2013). Seuls des Ag de très haute affinité sont capables d'activer le TCR avec une force suffisante pour contrer l'inhibition médiée par l'Ado et de permettre l'activation et la prolifération des LTCD8 naïfs. Dans ce contexte, l'expression de CD73 a été associée à un caractère de « cellule souche » au sein des LTCD8. De plus, ces cellules prolifèrent peu du fait de la présence d'Ado et d'une stimulation TCR insuffisante pour lever cette inhibition (Bono et al., 2015). L'expression de CD73 pourrait donc permettre, *via* l'induction d'Ado, de conserver un pool de LTCD8 naïfs ou « cellules souche like » dotés d'auto-renouvellement. Des données chez la souris, ont également mis en évidence que les LTCD8 mémoires producteurs d'IL-17A (Tc17) et sensibles à l'Ado conservent un phénotype proche de celui des cellules souches. En absence d'Ado, les Tc17 se différencient en effecteur Tc1 (production IFN- $\gamma$  et GzB) à courte durée de vie et ceci est associé à la perte d'expression de CD73 (Flores- Santibáñez et al., 2015). Sur des LTCD8 mémoires, l'expression sélective de CD73 sur des cellules de type Tc17 semble donc associée à un profil cellule souche dotée d'une longue durée de vie.

Sur les LTCD4, CD73 n'est pas exprimé par les cellules naïves mais est associée à une population de Teff pro-inflammatoire exprimant peu d'ICP inhibiteurs (*cf. Résultats-I*). Ceci suggère que CD73 est acquis au cours de la différenciation Th. CD73 pourrait agir sur cette population effectrice comme un « garde-fou » ou un mécanisme de régulation autocrine, *via* la production d'Ado, pour limiter ses fonctions pro-inflammatoires. Nous avons en effet démontré la capacité d'Ado à réduire la production de l'ensemble des cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , GM-CSF, IL-2, IFN $\gamma$ ) excepté IL-17A et à un niveau moindre IL-22 (*cf. Résultats-I*).

De manière intéressante, l'expression de CD73 sur par une sous population de LTCD8 effecteurs est associée, à l'instar des LTCD4, à la capacité de produire de l'IL-17A (Flores- Santibáñez et al., 2015). CD73 est également exprimé par plus de 90% des lymphocytes T $\gamma\delta$  en périphérie, et a récemment été proposé comme co-récepteur permettant la stabilisation de leur TCR et leur engagement dans la différenciation T $\gamma\delta$  (Coffey et al., 2014). Par ailleurs les LT $\gamma\delta$  produisent de l'IL-17A (Chien et al., 2013), et dans certains tissus comme la peau ils constituent la source majeure de cette cytokine (Cai et al., 2011). Il est important de noter que ces LT producteurs d'IL-17A

(CD8, CD4 et  $\gamma\delta$ ), expriment plus fréquemment et de manière plus importante, CD161, une glycoprotéine membranaire de type c-lectine dont l'expression dans les LT semble dépendante de ROR $\gamma$ t et qui est donc liée à la production d'IL-17A (Maggi et al., 2010). Il a de plus été montré que les cellules productrices d'IL-17A sont issues de LTCD4 naïves CD161<sup>+</sup> en réponse à l'action combinée d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23 (Cosmi et al., 2008). Dans le sang et le colon de patients atteints de la maladie de Crohn, les LTCD4 CD161<sup>+</sup> ont aussi été étudiés. Ils représentent un pool de Th17 "resting" qui peut être activé par IL-23 et induisant une inflammation tissulaire destructrice (Kleinschek et al., 2009). L'ensemble de ces données indiquent que CD161 est un marqueur des Th17 chez l'Homme.

Nous avons aussi pu confirmer l'expression plus forte de CD161 sur les Teff CD73<sup>+</sup> comparé aux Teff CD73<sup>neg</sup> (**donnée annexe**) en accord avec des données récentes dans la maladie de Crohn montrant l'expression préférentielle de CD73 sur les Teff exprimant CD161 (Bai et al., 2014). Ceci suggère fortement l'existence d'un lien entre ces deux molécules sur cette population.



**Donnée annexe.** Expression de CD161 évaluée par cytométrie de flux sur des Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> de donneur sain.

Des données récentes démontrent par ailleurs que l'expression de CD161 identifie un phénotype transcriptionnel et fonctionnel spécifique partagé par différents lignages T (Fergusson et al., 2014). Il y est notamment décrit que CD161 pourrait jouer un rôle de molécule de co-stimulation positive associée à l'activation TCR. Un des rôles non-enzymatiques de CD73 consiste également en une fonction de co-stimulation décrite par plusieurs équipes (Dianzani et al., 1993; Resta et al., 1998; Thompson et al., 1989),

permettant encore d'établir un lien éventuel entre la régulation de ces deux molécules. Au même titre que CD161, l'expression de CD73 sur les Teff pourrait donc faire partie des éléments caractérisant une voie de différenciation commune dans chacun des lignages considérés.

## **L'EXPRESSION DE MDR1 PAR LES TH1.17 CD73<sup>+</sup>, UN MECANISME PHYSIOLOGIQUE DE TOLERANCE DANS L'INTESTIN ?**

Dans la littérature, l'expression de CD161 est aussi associée à celle de MDR1 sur les LT chez l'Homme (Alsuliman et al., 2017; Turtle et al., 2009). De manière générale, le transporteur MDR1 est fortement exprimé par les LT effecteurs les plus exposés aux xénobiotiques, notamment au niveau du tractus digestif (Ramesh et al., 2014). Par ailleurs, dans l'intestin, l'environnement particulier très riche en pathogènes commensaux, toxines, acides biliaires, favorise le développement de Th1.17 qui y sont retrouvés en grand nombre. Les Th1.17 et les Th17 jouent notamment un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale en favorisant l'élimination des bactéries pathogènes *via* la sécrétion d'IL-17A et d'IL-22 qui stimulent la production de peptides antimicrobiens. L'IL-22 stimule également la prolifération et le renouvellement des cellules épithéliales intestinales. Dans une étude récente, Cao *et coll.* ont démontré que l'expression de MDR1 par les Th17 les protège du stress induit par les acides biliaires. Ils montrent notamment que la production de ROS est plus importante dans des Th n'exprimant pas MDR1 et que ceux-ci acquièrent un profil pro-inflammatoire dominant, retrouvé notamment dans la forme iléale de la maladie de Crohn (Cao et al., 2017). L'expression de MDR1 par ces cellules pourrait donc contribuer à leur survie et à leur fonction dans un environnement particulièrement hostile.

Nous avons décrit une fréquence élevée de Teff CD73<sup>+</sup> dans des biopsies de tissu de colon sain (*cf. Résultats-I*) connu pour être enrichi en Th17 et Th1.17 exprimant fortement MDR1 (Ramesh et al., 2014). De plus, nous avons démontré la forte expression de MDR1 par les Teff CD73<sup>+</sup> comparée aux CD73<sup>neg</sup> (*cf. Résultats-I&III*). L'ensemble de ces données suggère que dans l'environnement immunitaire de l'intestin, MDR1 et CD73 contribuent tous deux à maintenir sous contrôle l'inflammation médiée par les Th17 et les Th1.17 et agissent comme modulateurs de cette réponse. MDR1 détoxifie les Teff en permettant l'efflux de nombreuses drogues

et xénobiotiques tandis que CD73 assure une inhibition de leurs fonctions effectrices délétères *via* la production autocrine d'Ado qui inhibe la production de l'ensemble des cytokines inflammatoires excepté IL-17A et à un degré moindre IL-22 (*cf. Résultats-I*). Ces deux molécules instaurent donc un seuil de tolérance vis-à-vis des pathogènes commensaux bénéfiques pour l'hôte et des conditions extrêmes (notamment en terme de pH et de toxines présentes) propres à ce tissu. Il serait à présent intéressant d'étudier la chronologie des événements menant à la dérégulation de cette balance permettant l'activation des Teff dans l'intestin. Le contrôle de cette balance permettrait en effet de répondre à des attaques de pathogènes extérieurs mais le dérèglement ou la persistance de ce phénomène pourrait expliquer en partie les manifestations auto-immunes associées au tractus digestif.

De manière intéressante, il semble donc y avoir un lien fort entre l'expression de CD161, marquant un phénotype Th17 et Th1.17, MDR1 et CD73 par les Teff. L'ensemble de ces données suggère une régulation concertée de ces différents acteurs moléculaires en faveur de l'émergence d'une population effectrice puissante mais dont les fonctions sont finement régulées par ces différentes protéines.

### **QUEL(S) FACTEUR(S) INFLUENCE(NT) LA DIFFERENCIATION DE LA POPULATION EFFECTRICE CD4<sup>+</sup> EXPRIMANT CD73 ?**

Le phénotype singulier des Th1.17 suggère qu'il est associé à une voie de différenciation spécifique, bien qu'elle soit encore mal définie. Certains facteurs solubles tels que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 (Cosmi et al., 2008; Duhon and Campbell, 2014) semblent centraux mais pas nécessairement suffisants pour induire ce phénotype. L'analyse des facteurs entrant en jeu dans cette voie de polarisation pourrait notamment permettre de comprendre le mécanisme d'acquisition de CD73 qui est fortement associée à cette population Th1.17. Dans ce cadre, plusieurs questions restent en suspens quant à l'émergence de cette population effectrice CD4<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> et qui seraient, selon moi, importantes d'étudier.

### Les Teff CD73<sup>+</sup> ont-ils un répertoire TCR spécifique de certains Ag ?

L'analyse comparée des profils de répertoire TCR des Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> par technique TCRseq pourrait permettre de déterminer si les particularités phénotypiques de la population CD73<sup>+</sup> peuvent s'expliquer par la reconnaissance d'un répertoire antigénique restreint, comme cela a déjà été établi pour certaines sous-populations Th. L'identification des spécificités de répertoire TCR pourrait également fournir des hypothèses quant à la voie de différenciation menant à cette population effectrice exprimant CD73. Chez l'Homme, les Th1.17 reconnaissent en effet des motifs antigéniques exprimés par les bactéries de type *E. coli*, *S. pneumonia*, et certains champignons comme *C. albicans* alors que les Th17 reconnaissent des motifs antigéniques exprimés par de nombreuses bactéries filamenteuses segmentées. (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Duhon and Campbell, 2014; Zielinski et al., 2012). Des travaux récents montrent par ailleurs que ces populations Th peuvent influencer sur la réponse aux traitements dans différents contextes pathologiques. Ainsi, des antigènes tumoraux partageraient des motifs avec des antigènes bactériens de la flore commensale, indiquant que la composition du microbiote ainsi que l'histoire infectieuse des patients peut influencer sur l'efficacité de la réponse anti-tumorale (Zitvogel et al., 2015). Certaines souches de *Bacteroides* semblent notamment stimuler des réponses de type Th1 qui influencent positivement une immunothérapie utilisant l'anti-CTLA-4 (Ipilimumab) (Vétizou et al., 2015). Dans un modèle murin, il a également été montré que la présence de bactéries Gram<sup>+</sup> influe positivement sur l'efficacité d'un traitement anti-tumoral à base de cyclophosphamide (Viaud et al., 2013). En plus de sa fonction d'agent alkylant de l'ADN, cette molécule permet la translocation de bactéries Gram<sup>+</sup> de l'intestin grêle vers les OLS. Dans les OLS, ces bactéries stimulent la génération de Th1.17 qui contribuent ensuite à la réponse anti-tumorale. L'ajout d'antibiotiques ou l'utilisation d'animaux élevés en conditions axéniques montre que des résistances à un traitement par cyclophosphamide sont plus fréquentes dans ces conditions du fait d'une réponse anti-tumorale réduite.

Des analyses de répertoire TCR ont également permis de montrer dans la PR que des Th17 et des Th1.17 présentent une spécificité antigénique commune suggérant une trans-différenciation des Th17 en Th1.17 dans un contexte inflammatoire (van Hamburg and Tas, 2018).

L'étiologie de la PR et le RPso semble en effet indiquer que les infections par certains pathogènes peuvent augmenter le risque subséquent de développer ces pathologies auto-immunes. Cela s'explique en partie par le partage de certains épitopes de ces pathogènes avec des motifs antigéniques du soi (Cusick et al., 2012). Ce mécanisme de mimétisme moléculaire permettrait la survie et la prolifération de clones auto-réactifs, initialement développés contre un pathogène extérieur. Il semble aussi exister un lien entre le microbiote et la sévérité de certaines pathologies auto-immunes dont la PR. (Zhang et al., 2015). Il est important de noter que plusieurs des pathogènes impliqués favorisent l'émergence de réponses pro-inflammatoires de type Th1.17 et Th1 qui jouent un rôle majeur dans nombre de pathologies auto-immunes.

#### Le complément peut-il jouer un rôle dans l'induction de CD73 sur les Teff ?

Les données générées au laboratoire comparant le profil transcriptionnel des Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> nous ont également permis d'identifier une expression différentielle de plusieurs gènes codant pour des récepteurs ou des régulateurs de facteurs du complément (*ITGB2*, *CR1*, *CR2*, *C3AR1*, *CFH*, *CFHR3*, données non présentées). De manière intéressante, il a été récemment montré que certains éléments de la cascade du complément peuvent notamment favoriser la différenciation Th17 dans des cas de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD). Dans cette étude, le blocage du récepteur C3R inhibe la polarisation des LTCD4 en Th17 ou Th1 (Ma et al., 2014b). Mais à ce jour aucun lien n'a été fait entre ces éléments et l'expression de CD73.

#### Existe-t-il des facteurs de régulation épigénétique des Teff CD73<sup>+</sup> ?

Des travaux récents montrent que CD73 peut également être régulé sur le plan épigénétique dans les cellules épithéliales (Wang et al., 2012). Dans les cellules tumorales de cancer du sein, la méthylation des îlots CpG de *NT5E* est corrélée à une absence d'expression de CD73 et est associée à un bon pronostic. Par contre, les lignées cellulaires issues de TNBT qui expriment fortement CD73 et sont décrites comme particulièrement agressives, présentent toutes une déméthylation de ces îlots CpG (Lo Nigro et al., 2012). Dans le mélanome en revanche, une déméthylation des îlots CpG

n'est pas systématiquement corrélée à l'expression de CD73 au niveau protéique (Reinhardt et al., 2017).

Des expériences de PCR méthylation spécifique réalisées au cours de ma thèse (cf. **Résultats-IV**) sur les Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> mais aussi des LTCD8 naïfs (CD73<sup>+</sup>) m'ont permis de démontrer que, la transcription de *NT5E* dans les LT n'est pas régulée par une méthylation différentielle de son promoteur. Il serait important d'investiguer d'autres mécanismes régulant la transcription de *NT5E* dans les lymphocytes chez l'Homme. Des techniques récentes comme l'ATAC-Seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin, (Buenrostro et al., 2013; Corces et al., 2016)) comparant l'occupation du promoteur de *NT5E* et d'autres gènes associés (*ABCBI*, *IL-17A*, *NKR-PI* qui code pour CD161) dans les populations de Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup>, pourraient nous permettre de mieux comprendre s'il existe des mécanismes de co-régulation de ces différents gènes. Cette technique a pour intérêt d'être très sensible, tout en ne nécessitant qu'une quantité restreinte de matériel biologique initial ce qui la rend utilisable sur des populations peu fréquentes.

#### Quels facteurs solubles sont capables d'induire l'expression de CD73 sur des Teff humains ?

Plusieurs molécules, notamment des cytokines, dont les IFN de type I, favorisent l'expression de CD73 sur les cellules endothéliales et épithéliales (Kiss et al., 2007; Niemelä et al., 2004) alors qu'aucun effet n'est observé quelle que soit la dose utilisée ou le mode de délivrance (cytokines recombinantes ou co-culture avec cellules productrices) sur les Teff CD73<sup>+</sup> ou CD73<sup>neg</sup> (données non montrées). Des résultats obtenus dans des modèles murins suggèrent que le TGF- $\beta$  permet d'induire l'expression de CD73 sur les LT (Chalmin et al., 2012; Flores- Santibáñez et al., 2015). Cependant, il est important de noter que chez la souris, CD73 est exprimée par les Treg murins dont la différenciation est partiellement dépendante du TGF- $\beta$  (Chen et al., 2003) ce qui n'est pas le cas chez l'Homme (cf **Resultats-I**). Chez l'Homme, des données montrent en revanche que l'absence de TGF $\beta$  favorise la différenciation des Th1.17 (Hakemi et al., 2011) qui représentent une forte proportion des Teff CD73<sup>+</sup> (cf. **Résultats-I**). Cela suggère que le TGF- $\beta$ , plutôt que d'induire l'expression de CD73 pourrait être un régulateur négatif de son expression. En fonction de la dose de TGF- $\beta$  utilisée, une modulation plus ou moins forte de l'expression de CD73 pourrait être

observée. De manière intéressante, chez la souris, l'IL-21 a été décrite comme favorisant l'expression de CD73 sur les LT $\gamma$  $\delta$  (Barjon et al., 2017) or l'IL-21 est impliquée, chez l'Homme, dans la polarisation Th17 et Th1.17 (Yang et al., 2008). Cette cytokine est de plus actuellement évaluée comme cible thérapeutique potentielle dans la PR (Dinesh and Rasool). Il a en effet été montré une diminution de la population de Teff co-produisant de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$  dans un modèle murin d'arthrite induite par un challenge antigénique, KO pour IL-21 (Marijnissen et al., 2014). Il serait donc intéressant d'évaluer si cette cytokine promouvant la polarisation Th17 et Th.17, peut induire l'expression de CD73 sur des LTCD4 humains.

L'identification des facteurs solubles contribuant à l'acquisition de CD73 par les Teff pourrait notamment avoir un intérêt en contexte pathologique puisque la génération d'inhibiteurs spécifiques pourrait permettre de moduler l'expression de CD73 sur les LT pour réduire la génération d'Ado dans un contexte tumoral.

## **LA RESTAURATION DE L'EXPRESSION DE CD73 SUR LES TEFF DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES : UN MOYEN D'ENRAYER L'INFLAMMATION CHRONIQUE ?**

Dans l'étude menée sur des patients atteints de PR ou de RPso (*cf. Résultats-II*), nous avons pu mettre en évidence une diminution significative du niveau de CD73 sur les Teff en périphérie chez des patients non traités. Nous avons fait l'hypothèse que cette réduction d'expression de CD73 associée à l'augmentation d'expression de CD39 sur les Treg et sur les Teff CD73<sup>neg</sup> pouvait refléter le niveau d'activation de cette population polyfonctionnelle pro-inflammatoire. Nous n'avons pour autant pas pu associer ces niveaux d'expression à la sévérité de la pathologie comme cela a été suggéré dans l'AIJ (Botta Gordon- Smith et al., 2015) du fait de la faible taille des cohortes de patients que nous avons pu analyser. Les niveaux d'expression de CD73 en périphérie reflètent cependant le même phénomène accentué au niveau des articulations inflammées.

Une étude récente a par ailleurs montré, chez des patients atteints de maladie de Crohn, que la présence accrue de Teff CD39<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> producteurs d'IL-17A corrèle avec une pathologie plus agressive (Bai et al., 2014). Cette population exprime aussi plus ADA qui hydrolyse efficacement l'Ado en inosine la rendant insensible à son effet



immunosupresseur. Cette surexpression d'ADA peut s'expliquer par l'état d'activation puisque nous avons montré l'augmentation d'expression d'ADA sur les Teff CD73<sup>+</sup> après activation TCR (*cf.* **Résultats-I**). Le taux d'ADA est un marqueur d'inflammation dans le sérum des patients atteints de PR (Vinapamula et al., 2015). Il serait donc important d'analyser l'expression d'ADA par les Teff CD73<sup>+</sup> et CD73<sup>neg</sup> dans la PR pour définir si les Teff CD73<sup>+</sup> résiduels participent à l'inflammation du fait de la transformation rapide de l'Ado généré en Inosine.

Nous avons également pu montrer que dans la PR et le RPso, l'expression de CD73 est réduite sur les Th1.17 mais aussi les Th1 (*cf.* **Résultats-III**), ce qui constitue un résultat intrigant, l'expression de CD73 étant largement associée aux phénotypes Th17 et Th1.17 (*cf.* **Résultats-I**). Dans les contextes d'auto-immunité, les Th1 représentent toutefois une population importante qui peut être fortement activée (Dardalhon et al., 2008b). Dans notre étude, les Th1 ont été identifiés sur la base de l'expression des chimiokines récepteurs CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>neg</sup> qui pourrait compter une fraction de cellules Th1 « non classiques ». Ceux-ci sont en effet majoritairement de phénotype CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> mais peuvent aussi être CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>neg</sup> (Basdeo et al., 2017; Maggi et al., 2012). Ces Th1 « non classiques » présentent une forte activité pro-inflammatoire notamment *via* leur coproduction d'IFN- $\gamma$  et GM-CSF. Il serait donc important de mieux caractériser chez les patients PR et RPso la part respective de Th1 « classiques » et « non classiques » parmi les cellules CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>neg</sup> étant donné que cette ségrégation n'est actuellement faisable que sur leur capacité de production de cytokines.

#### La restauration de l'expression de CD73 sur les LT peut-elle constituer un marqueur de réponse au MTX ?

Une faible expression de CD73 par les LTCD8 et les LB synoviaux a été proposée comme marqueur de la sévérité de l'AIJ (Botta Gordon- Smith et al., 2015). Les auteurs n'ont cependant pas observé de variation significative du niveau d'expression de CD73 sur les populations considérées après 6 mois de traitement par MTX, indépendamment de la réponse au traitement des patients. Nous avons pu montrer que des patients atteints de PR ou de RPso traités par MTX semblent retrouver un niveau d'expression de CD73 qui se rapproche des niveaux moyens observés chez des donneurs sains sur les populations de Th inflammatoires (*cf.* **Résultats-III**). Cette

restauration d'expression de CD73 sur les T<sub>H</sub>17 de patients pourrait augmenter l'effet anti-inflammatoire du MTX en accentuant la production d'Ado immunosuppresseur (Moncrieffe et al., 2010; Zhou et al., 2009). De plus, nous avons pu mettre en évidence que le niveau d'expression de CD73 en périphérie chez des patients non traités reflète la pathologie au site inflammatoire. Cependant chez des sujets traités, il n'est pas garanti que l'effet du MTX observé en périphérie soit aussi fort au niveau des sites inflammés dans lesquels la concentration en facteurs solubles pro-inflammatoires est beaucoup plus forte ce qui peut fortement contrebalancer ces effets anti-inflammatoires.

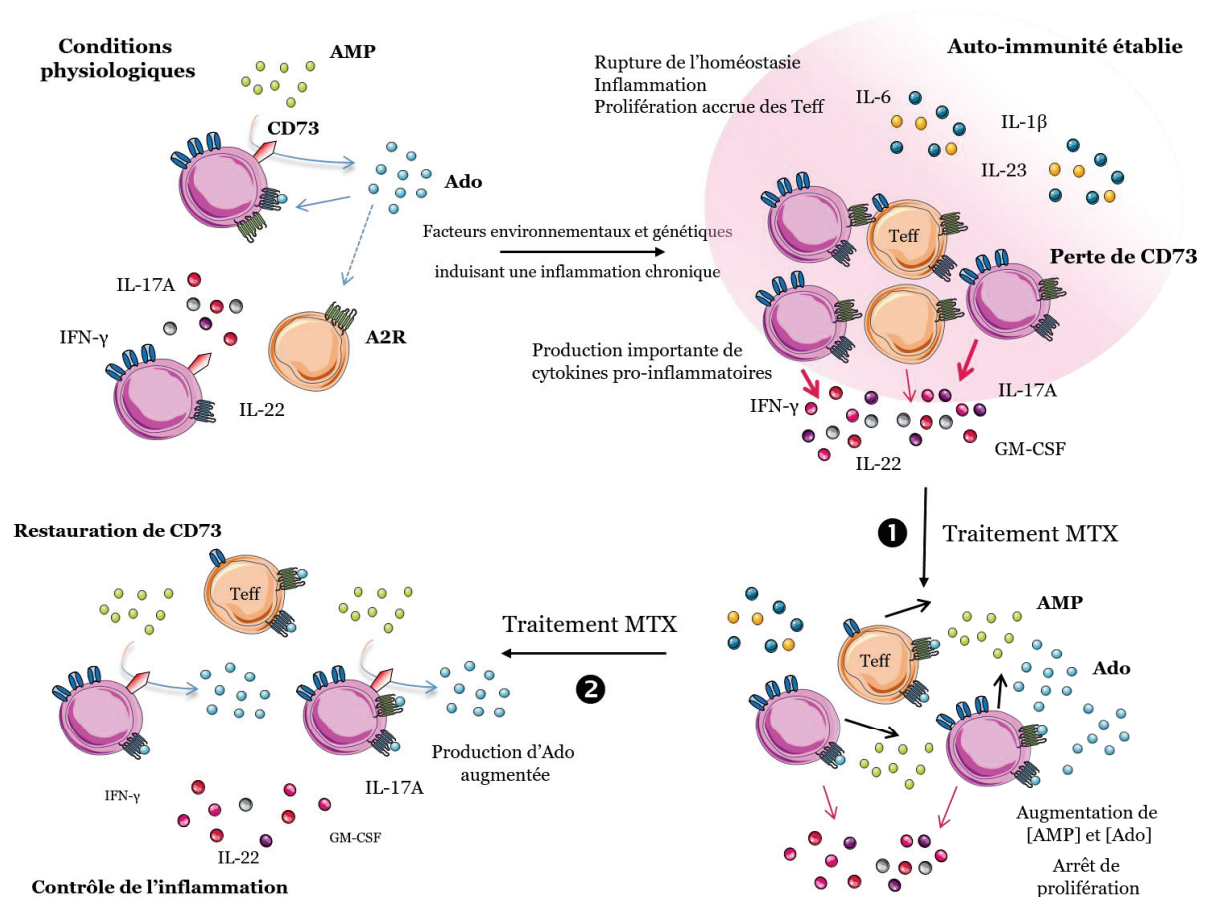
Ce jeu de perte et d'acquisition d'expression des ecto-enzymes CD73 et CD39 sur les populations de T<sub>H</sub>17 pro-inflammatoires et régulatrices pourrait être un moyen de suivre l'évolution de la pathologie chez les patients en considérant les variations d'expression de ces deux marqueurs après introduction d'un traitement. Il reste néanmoins indispensable d'obtenir une validation de ces observations aux sites de l'inflammation après traitement MTX bien que ces prélèvements soient difficilement accessibles chez des patients répondeurs du fait de la réduction de l'inflammation.

## **VERS DES COMBINAISONS THERAPEUTIQUES VISANT A AUGMENTER LA FONCTION ENZYMATIQUE DE CD73 DANS LES PATHOLOGIES AUTO-IMMUNES ?**

En contexte de pathologies auto-immunes, la restauration d'expression de CD73 semble une alternative séduisante pour renforcer l'immunosuppression initiée par des DMARD tels que MTX en amplifiant leurs effets anti-inflammatoires. Dans notre modèle, l'utilisation de MTX présente également l'avantage de ne pas être un substrat de MDR1 (*cf. revue MDR1*). Il ne devrait donc pas permettre contrairement à ce que nous avons montré pour le paclitaxel (*cf. Résultats-II*), de sélectionner cette population CD73<sup>+</sup>. MTX est en effet pris en charge par le transporteur canonique MRP1, codé par le gène *ABCC1* qui fait également partie de la famille des transporteurs ABC. L'expression de MRP1 sur PBMC humains totaux a été observée au début des années 2000 (Meaden et al., 2002; Moon et al., 2007) sans analyse détaillée des populations l'exprimant. Une étude précise de l'expression de MRP1 sur les différentes sous populations de T<sub>H</sub> ainsi que sur les Treg de patients permettrait d'évaluer si une

augmentation d'expression ou au contraire un défaut peuvent moduler la réponse au MTX.

Cela a été décrit pour MDR1 dans la réponse aux glucocorticoïdes dans la maladie de Crohn (Ramesh et al., 2014). Il est donc important de prendre en compte les caractéristiques de cette population dans le choix du traitement pour la pathologie auto-immune considérée. Certaines drogues efficaces contre les symptômes peuvent en effet conduire à la sélection de cette population Th1.17 pro-inflammatoire dont l'expansion pourrait en partie expliquer les nombreux cas de résistance observés.



Modèle proposé pour l'expression dynamique de CD73 sur les Teff et ses conséquences dans la physiopathologie de la PR et son traitement par MTX.

Pour la restauration d'une activité AMPase forte des Teff, favorable à une limitation Ado-médiée de l'inflammation, la combinaison de MTX et d'anticorps bloquants anti-IL-17A (Ixekizumab, Secukinumab) ou anti-IL-17RA (Brodalumab) présente un

intérêt certain. En effet, MTX permet augmenter les niveaux extracellulaires d'Ado et d'AMP (Cronstein, 2005) et restaure l'expression de CD73 qui peut, en favorisant la génération d'Ado, participer à l'amplification des effets anti-inflammatoires induit par MTX sans modifier la sécrétion d'IL-17A et d'IL-22 par les Teff CD73<sup>+</sup> (Gourdin et al., 2018; Herrath et al., 2014). Compte tenu du rôle majeur de l'IL-17A dans la physiopathologie des maladies auto-immunes notamment la PR et le RPso (cf. **Introduction-III**), il apparaît donc très important de bloquer cette voie en parallèle pour augmenter le taux de réponse des patients et ainsi accentuer l'effet du MTX.

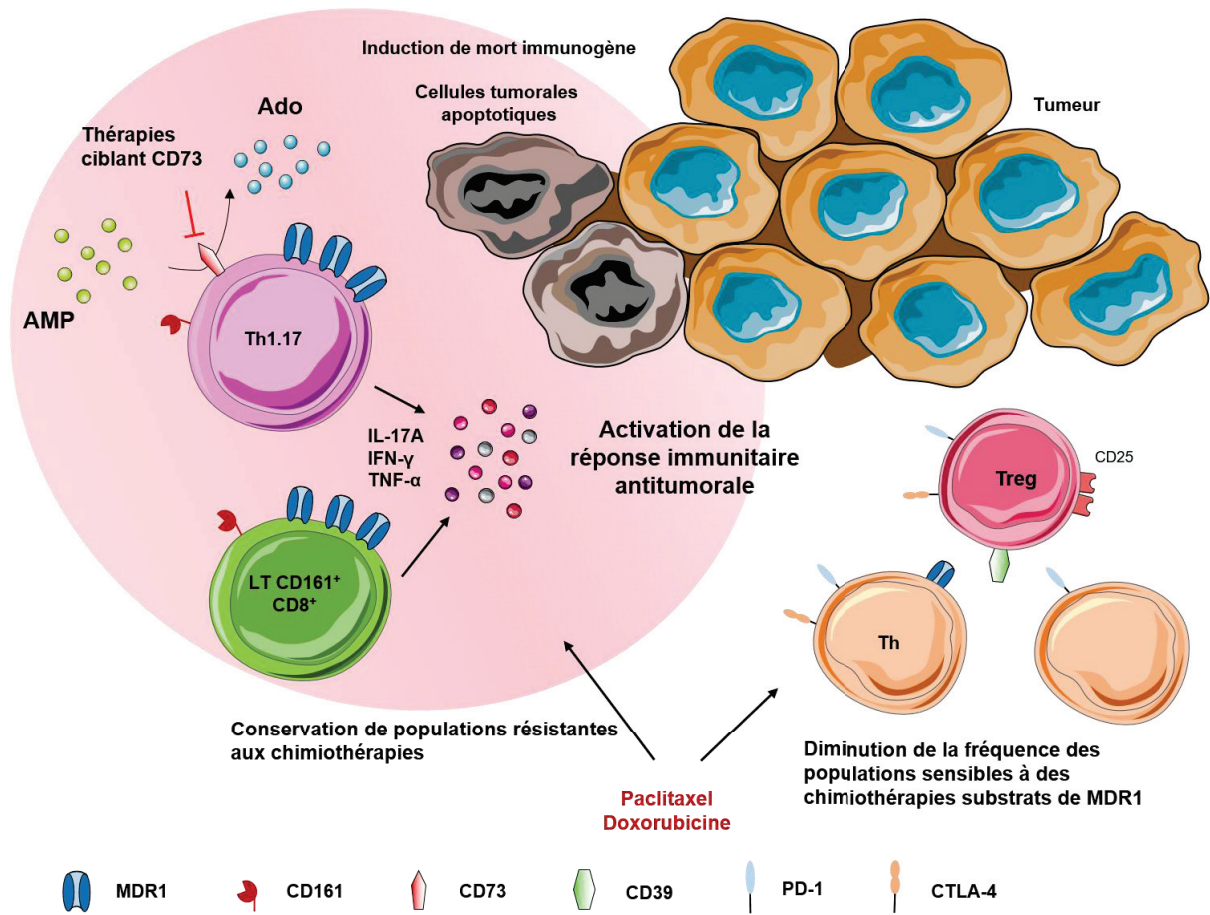
### **L'EXPRESSION DE MDR1 PAR LES TEFF CD73<sup>+</sup> POURRAIT PRESENTER UN AVANTAGE SELECTIF EN CONTEXTE TUMORAL**

En contexte tumoral en revanche, un rationnel thérapeutique visant à combiner des agents de chimiothérapie substrats de MDR1 (paclitaxel, doxorubicine) et des immunothérapies bloquant l'activité enzymatique de CD73 pourrait permettre de sélectionner la population de Teff CD73<sup>+</sup> pro-inflammatoire. Cette approche pourrait être intéressante dans le traitement du cancer du sein notamment dans lequel peu de résistance des cellules tumorales mammaires dépendant de MDR1 ont été décrites (Hegewisch-Becker et al., 1998). De plus, les chimiothérapies de la famille des anthracyclines qui intègre le paclitaxel favorise une mort immunogène des cellules tumorales qui est favorable à l'initiation ou la réactivation de la réponse immune anti-tumorale (Fucikova et al., 2011). En contrepartie, le paclitaxel a également été décrit comme pouvant favoriser l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales, qui peut inhiber la fonctionnalité des LT infiltrants exprimant PD-1 (Zhang et al., 2008). Néanmoins, dans l'environnement tumoral du cancer du sein et de l'ovaire, les Teff CD73<sup>+</sup> n'expriment que très peu d'ICP inhibiteurs dont PD-1 (cf. **Résultats-I**), cette augmentation de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales n'aura que peu d'impact sur leurs fonctions anti-tumorales.

Il serait potentiellement intéressant d'affiner les critères d'inclusion pour sélectionner les patientes les plus susceptibles de répondre en fonction de leurs caractéristiques cliniques (sous type moléculaire, fréquence de CD73 dans les lymphocytes infiltrant la tumeur et/ou dans les Teff du sang périphérique). Dans le cadre d'une cohorte rétrospective de patientes traitées par chimio néo-adjuvante par paclitaxel, nous

évaluerons l'enrichissement et la fonctionnalité des Teff CD73<sup>+</sup>MDR1<sup>+</sup> dans l'environnement tumoral (blocs FFPE) et le sang périphérique (PBMC congelés) avant et pendant le traitement et les corrèlerons à la réponse au traitement (réponse pathologique complète à la chirurgie) pour valider la participation de cette population de Teff CD73<sup>+</sup> dans l'efficacité de la chimiothérapie (projet de thèse A. Di Roio). Nous évaluerons ainsi si le taux de Teff CD73<sup>+</sup> MDR1<sup>+</sup> corrèle à un score de le Chevalier faible des patientes (*i.e.* répondant bien à la chimiothérapie néo-adjuvante).

En définitive, ces résultats pourraient permettre d'argumenter en faveur de l'établissement d'une nouvelle combinaison thérapeutique. L'hypothèse serait d'allier une thérapie bloquant l'activité enzymatique de CD73 (anticorps (Novartis, InnatePharma, Corvus (CPX-006), Medimmune (MEDI9447)) ou inhibiteurs allostériques (AB680, Arcus Biosciences)) ou bloquant l'activité d'A2AR (Corvus Pharma (CPI-444), Evotec, GSK) avec une chimiothérapie substrat de MDR1. Cela permettrait la sélection de LT polyfonctionnels exprimant MDR1 pouvant contribuer efficacement à la réponse anti-tumorale.



Modèle récapitulant les modulations de l'infiltrat en LT envisagés dans des tumeurs solides sensibles aux chimiothérapies substrats de MDR1, induisant une mort immunogène et favorisant une réponse anti-tumorale efficace.



## **CONCLUSION GENERALE**

---

Les résultats présentés dans ce manuscrit visant à mieux caractériser la population de Teff CD73<sup>+</sup> chez l'Homme ont permis de montrer qu'elle présente un phénotype singulier fortement enrichi en cellules pro-inflammatoires à dominante Th1.17 et Th17. Elle exprime aussi fortement le transporteur membranaire MDR1 la rendant résistante à l'introduction de traitements par des drogues substrats de MDR1. Son étude dans différents contextes pathologiques permet d'entrevoir la possibilité de générer des outils thérapeutiques basés sur la modulation de l'expression et de la fonctionnalité de CD73 par cette population.





## REFERENCES

---

- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942–949.
- Adinolfi, E., Callegari, M.G., Ferrari, D., Bolognesi, C., Minelli, M., Wieckowski, M.R., Pinton, P., Rizzuto, R., and Di Virgilio, F. (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.
- Airas, L., Niemelä, J., Salmi, M., Puurunen, T., Smith, D.J., and Jalkanen, S. (1997). Differential Regulation and Function of CD73, a Glycosyl-Phosphatidylinositol–linked 70-kD Adhesion Molecule, on Lymphocytes and Endothelial Cells. *J. Cell Biol.* 136, 421–431.
- Alam, M.S., Kurtz, C.C., Rowlett, R.M., Reuter, B.K., Wiznerowicz, E., Das, S., Linden, J., Crowe, S.E., and Ernst, P.B. (2009). CD73 Is Expressed by Human Regulatory T Helper Cells and Suppresses Proinflammatory Cytokine Production and *Helicobacter felis*–Induced Gastritis in Mice. *J. Infect. Dis.* 199, 494–504.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1580–1588.
- Alice Long, S., and Buckner, J.H. (2011). CD4+FOXP3+ Treg in human autoimmunity: more than a numbers game. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 2061–2066.
- Allard, B., Longhi, M.S., Robson, S.C., and Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* 276, 121–144.
- Allen, J.E., and Sutherland, T.E. (2014). Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Semin. Immunol.* 26, 329–340.
- d’Almeida, S.M., Kauffenstein, G., Roy, C., Basset, L., Papargyris, L., Henrion, D., Catros, V., Ifrah, N., Descamps, P., Croue, A., et al. (2016). The ecto-ATPDase CD39 is involved in the acquisition of the immunoregulatory phenotype by M-CSF-macrophages and ovarian cancer tumor-associated macrophages: Regulatory role of IL-27. *Oncoimmunology* 5.
- Alpizar-Rodríguez, D., and Finckh, A. (2017). Environmental factors and hormones in the development of rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.* 39, 461–468.
- Alpizar-Rodríguez, D., Pluchino, N., Canny, G., Gabay, C., and Finckh, A. (2017). The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 56, 1254–1263.

- Alsuliman, A., Muftuoglu, M., Khoder, A., Ahn, Y.-O., Basar, R., Verneris, M.R., Muranski, P., Barrett, A.J., Liu, E., Li, L., et al. (2017). A subset of virus-specific CD161+ T cells selectively express the multidrug transporter MDR1 and are resistant to chemotherapy in AML. *Blood* *129*, 740–758.
- Andersen, M.H., Schrama, D., thor Stratén, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T Cells. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 32–41.
- Anderson, P., and Gonzalez-Rey, E. (2010). Vasoactive Intestinal Peptide Induces Cell Cycle Arrest and Regulatory Functions in Human T Cells at Multiple Levels. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2537–2551.
- Andrew, D.P., Ruffing, N., Kim, C.H., Miao, W., Heath, H., Li, Y., Murphy, K., Campbell, J.J., Butcher, E.C., and Wu, L. (2001). C-C Chemokine Receptor 4 Expression Defines a Major Subset of Circulating Nonintestinal Memory T Cells of Both Th1 and Th2 Potential. *J. Immunol.* *166*, 103–111.
- Annes, J.P., Chen, Y., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2004). Integrin  $\alpha V\beta 6$ -mediated activation of latent TGF- $\beta$  requires the latent TGF- $\beta$  binding protein-1. *J. Cell Biol.* *165*, 723–734.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2015). Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. *Immunology* *144*, 343–351.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., and Haskó, G. (2013a). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* *19*, 355–367.
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., and Haskó, G. (2013b). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 842–857.
- Antonioli, L., Yegutkin, G.G., Pacher, P., Blandizzi, C., and Haskó, G. (2016). Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities. *Trends Cancer* *2*, 95–109.
- Aswad, F., and Dennert, G. (2006). P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes. *Cell. Immunol.* *243*, 58–65.
- Aswad, F., Kawamura, H., and 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.
- Bai, A., Moss, A., Kokkotou, E., Usheva, A., Sun, X., Cheifetz, A., Zheng, Y., Longhi, M.S., Gao, W., Wu, Y., et al. (2014). CD39 and CD161 modulate T helper type 17 responses in Crohn's disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 3366–3377.
- Bai, A., Moss, A., Rothweiler, S., Serena Longhi, M., Wu, Y., Junger, W.G., and Robson, S.C. (2015). NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8+ T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nat. Commun.* *6*.
- Barber, E.K., Dasgupta, J.D., Schlossman, S.F., Trevillyan, J.M., and Rudd, C.E. (1989). The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 3277–3281.

- Barjon, C., Michaud, H.-A., Fages, A., Dejou, C., Zampieri, A., They, L., Gennetier, A., Sanchez, F., Gros, L., Eliaou, J.-F., et al. (2017). IL-21 promotes the development of a CD73-positive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology* 7, e1379642.
- Barletta, K.E., Ley, K., and Mehrad, B. (2012). Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 856–864.
- Bartok, B., and Firestein, G.S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 233, 233–255.
- Basdeo, S.A., Cluxton, D., Sulaimani, J., Moran, B., Canavan, M., Orr, C., Veale, D.J., Fearon, U., and Fletcher, J.M. (2017). Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 198, 2249–2259.
- Bastid, J., Regairaz, A., Bonnefoy, N., Déjou, C., Giustiniani, J., Laheurte, C., Cochaud, S., Laprevotte, E., Funck-Brentano, E., Hemon, P., et al. (2015). Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol. Res.* 3, 254–265.
- Batycka-Baran, A., Maj, J., Wolf, R., and Szepietowski, J.C. (2014). The New Insight into the Role of Antimicrobial Proteins-Alarmins in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J. Immunol. Res.* 2014.
- Beavis, P.A., Slaney, C.Y., Milenkovski, N., Henderson, M.A., Loi, S., Stagg, J., Kershaw, M.H., and Darcy, P.K. (2015). CD73: A potential biomarker for anti-PD-1 therapy. *Oncoimmunology* 4.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* 110, 493–497.
- Bellingan, G., Maksimow, M., Howell, D.C., Stotz, M., Beale, R., Beatty, M., Walsh, T., Binning, A., Davidson, A., Kuper, M., et al. (2014). The effect of intravenous interferon-beta-1a (FP-1201) on lung CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: an open-label study. *Lancet Respir. Med.* 2, 98–107.
- Benevides, L., Cardoso, C.R.B., Tiezzi, D.G., Marana, H.R.C., Andrade, J.M., and Silva, J.S. (2013). Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur. J. Immunol.* 43, 1518–1528.
- Benevides, L., Fonseca, D.M. da, Donate, P.B., Tiezzi, D.G., Carvalho, D.D.D., Andrade, J.M. de, Martins, G.A., and Silva, J.S. (2015). IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Res.* 75, 3788–3799.
- Benham, H., Norris, P., Goodall, J., Wechalekar, M.D., FitzGerald, O., Szentpetery, A., Smith, M., Thomas, R., and Gaston, H. (2013). Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R136.
- Berchtold, S., Ogilvie, A.L., Bogdan, C., Mühl-Zürbes, P., Ogilvie, A., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (1999). Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett.* 458, 424–428.

- Berke, G. (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* *81*, 9–12.
- Blay, J., White, T.D., and Hoskin, D.W. (1997). The Extracellular Fluid of Solid Carcinomas Contains Immunosuppressive Concentrations of Adenosine. *Cancer Res.* *57*, 2602–2605.
- Bluett, J., and Barton, A. (2012). What have genome-wide studies told us about psoriatic arthritis? *Curr. Rheumatol. Rep.* *14*, 364–368.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. (1998). Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* *187*, 129–134.
- Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F.-X., Nau, F., Guillet, G., Dagregorio, G., Yssel, H., et al. (2007). A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* *150*, 407–415.
- Boniface, K., Blumenschein, W.M., Brovont-Porth, K., McGeachy, M.J., Basham, B., Desai, B., Pierce, R., McClanahan, T.K., Sadekova, S., and Malefyt, R. de W. (2010). Human Th17 Cells Comprise Heterogeneous Subsets Including IFN- $\gamma$ -Producing Cells with Distinct Properties from the Th1 Lineage. *J. Immunol.* *185*, 679–687.
- Bono, M.R., Fernández, D., Flores-Santibáñez, F., Roseblatt, M., and Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* *589*, 3454–3460.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Mitri, D.D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* *110*, 1225–1232.
- Boswell-Casteel, R.C., and Hays, F.A. (2017). Equilibrative nucleoside transporters-A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* *36*, 7–30.
- Botta Gordon-Smith, S., Ursu, S., Eaton, S., Moncrieffe, H., and Wedderburn, L.R. (2015). Correlation of Low CD73 Expression on Synovial Lymphocytes With Reduced Adenosine Generation and Higher Disease Severity in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* *Hoboken Nj* *67*, 545–554.
- Bouma, M.G., Stad, R.K., Wildenberg, F.A. van den, and Buurman, W.A. (1994). Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J. Immunol.* *153*, 4159–4168.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* *112*, 358–404.
- Braun, T., and Zwerina, J. (2011). Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *13*, 235.
- Brown, P.M., Pratt, A.G., and Isaacs, J.D. (2016). Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 731–742.

- Buenrostro, J.D., Giresi, P.G., Zaba, L.C., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods* *10*, 1213–1218.
- Buisseret, L., Garaud, S., Allard, B., Cousineau, I., Chouinard, G., Sotiriou, C., Willard-Gallo, K., and Stagg, J. (2015). Abstract 3361: CD73 expression on tumor-infiltrating breast cancer leukocytes. *Cancer Res.* *75*, 3361–3361.
- Buisseret, L., Pommey, S., Allard, B., Garaud, S., Bergeron, M., Cousineau, I., Ameye, L., Bareche, Y., Paesmans, M., Crown, J.P.A., et al. (2018). Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: multiplex analysis of a phase III clinical trial. *Ann. Oncol.* *29*, 1056–1062.
- Burman, A., Haworth, O., Bradfield, P., Parsonage, G., Filer, A., Thomas, A.M.C., Amft, N., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2005). The role of leukocyte-stromal interactions in chronic inflammatory joint disease. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *72*, 10–16.
- Busse, K., and Liao, W. (2010). Which Psoriasis Patients Develop Psoriatic Arthritis? *Psoriasis Forum Natl. Psoriasis Found.* *16*, 17–25.
- Butler Jared J., Mader Jamie S., Watson Carrie L., Zhang Hong, Blay Jonathan, and Hoskin David W. (2003). Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: Role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* *89*, 975–991.
- Cai, X.-Y., Wang, X.-F., Li, J., Dong, J.-N., Liu, J.-Q., Li, N.-P., Yun, B., and Xia, R.-L. (2015). Overexpression of CD39 and high tumoral CD39<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 14757–14764.
- Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V.R., Zhang, H., Wang, T., Zheng, J., et al. (2011). Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Inflammation. *Immunity* *35*, 596–610.
- Campbell, J.J., Ebsworth, K., Ertl, L.S., McMahon, J.P., Newland, D., Wang, Y., Liu, S., Miao, Z., Dang, T., Zhang, P., et al. (2017). IL-17–Secreting  $\gamma\delta$  T Cells Are Completely Dependent upon CCR6 for Homing to Inflamed Skin. *J. Immunol.* *ji1700826*.
- Canale, F.P., Ramello, M.C., Núñez, N., Furlan, C.L.A., Bossio, S.N., Serrán, M.G., Boari, J.T., Castillo, A. del, Ledesma, M., Sedlik, C., et al. (2018). CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8<sup>+</sup> T Cells. *Cancer Res.* *78*, 115–128.
- Cao, W., Kayama, H., Chen, M.L., Delmas, A., Sun, A., Kim, S.Y., Rangarajan, E.S., McKevitt, K., Beck, A.P., Jackson, C.B., et al. (2017). The Xenobiotic Transporter Mdr1 Enforces T Cell Homeostasis in the Presence of Intestinal Bile Acids. *Immunity* *47*, 1182–1196.e10.
- Cekic, C., and Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 177–192.
- Cekic, C., Sag, D., Day, Y.-J., and Linden, J. (2013). Extracellular adenosine regulates naive T cell development and peripheral maintenance. *J. Exp. Med.* *jem.20130249*.

- Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Végran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangère, V., Vincent, J., Masson, D., et al. (2012). Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity* 36, 362–373.
- Chatterjee, D., Tufa, D.M., Baehre, H., Hass, R., Schmidt, R.E., and Jacobs, R. (2014a). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood* 123, 594–595.
- Chatterjee, S., Thyagarajan, K., Kesarwani, P., Song, J.H., Soloshchenko, M., Fu, J., Bailey, S.R., Vasu, C., Kraft, A.S., Paulos, C.M., et al. (2014b). Reducing CD73 Expression by IL1 $\beta$ -Programmed Th17 Cells Improves Immunotherapeutic Control of Tumors. *Cancer Res.* 74, 6048–6059.
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J.F., Wynn, T.A., and Gause, W.C. (2012). An essential role for the Th2-type response in limiting tissue damage during helminth infection. *Nat. Med.* 18, 260–266.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chen, W.-C., Lai, Y.-H., Chen, H.-Y., Guo, H.-R., Su, I.-J., and Chen, H.H.W. (2013). Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology* 63, 225–233.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314, 1792–1795.
- Chien, Y., Zeng, X., and Prinz, I. (2013). The natural and the inducible: IL-17 producing gamma delta T cells. *Trends Immunol.* 34, 151–154.
- Choy, E. (2012). Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51, v3–v11.
- Chrobak, P., Charlebois, R., Rejtar, P., Bikai, R.E., Allard, B., and Stagg, J. (2015). CD73 Plays a Protective Role in Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* 194, 2487–2492.
- Chung, A.S., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Kasman, I., Zhang, J., Vernes, J.-M., Jiang, Z., Meng, Y.G., Peale, F.V., et al. (2013). An interleukin-17–mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Med.* 19, 1114–1123.
- Ciccia, F., Guggino, G., Rizzo, A., Manzo, A., Vitolo, B., La Manna, M.P., Giardina, G., Sireci, G., Dieli, F., Montecucco, C.M., et al. (2015). Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 54, 2264–2272.
- Ciocon, D.H., and Kimball, A.B. (2007). Psoriasis and psoriatic arthritis: separate or one and the same? *Br. J. Dermatol.* 157, 850–860.

- Coffey, F., Lee, S.-Y., Buus, T.B., Lauritsen, J.-P.H., Wong, G.W., Joachims, M.L., Thompson, L.F., Zúñiga-Pflücker, J.C., Kappes, D.J., and Wiest, D.L. (2014). The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks  $\gamma\delta$  lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. *J. Exp. Med.* *211*, 329–343.
- Cohen, C.J., Crome, S.Q., MacDonald, K.G., Dai, E.L., Mager, D.L., and Levings, M.K. (2011). Human Th1 and Th17 Cells Exhibit Epigenetic Stability at Signature Cytokine and Transcription Factor Loci. *J. Immunol.* *187*, 5615–5626.
- Cohen, H.B., Briggs, K.T., Marino, J.P., Ravid, K., Robson, S.C., and Mosser, D.M. (2013). TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. *Blood* *122*, 1935–1945.
- Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T., and Thompson, L.F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* *2*, 351.
- Corces, M.R., Buenrostro, J.D., Wu, B., Greenside, P.G., Chan, S.M., Koenig, J.L., Snyder, M.P., Pritchard, J.K., Kundaje, A., Greenleaf, W.J., et al. (2016). Lineage-specific and single cell chromatin accessibility charts human hematopoiesis and leukemia evolution. *Nat. Genet.* *48*, 1193–1203.
- Cosmi, L., Annunziato, F., Iwasaki, M., Galli, G., Manetti, R., Maggi, E., Nagata, K., and Romagnani, S. (2000). CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur. J. Immunol.* *30*, 2972–2979.
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., et al. (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* *205*, 1903–1916.
- Cretenet, G., Clerc, I., Matias, M., Loisel, S., Craveiro, M., Oburoglu, L., Kinet, S., Mongellaz, C., Dardalhon, V., and Taylor, N. (2016). Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. *Sci. Rep.* *6*.
- Cronstein, B.N. (2005). Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Pharmacol. Rev.* *57*, 163–172.
- Cronstein, B.N., and Sitkovsky, M. (2017). Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 41–51.
- Cronstein, B.N., Daguma, L., Nichols, D., Hutchison, A.J., and Williams, M. (1990). The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J. Clin. Invest.* *85*, 1150–1157.
- Csóka, B., Selmečzy, Z., Koscsó, B., Németh, Z.H., Pacher, P., Murray, P.J., Kepka-Lenhart, D., Morris, S.M., Gause, W.C., Leibovich, S.J., et al. (2012). Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J.* *26*, 376–386.



- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.
- Curiel, T.J. (2007). Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* *117*, 1167–1174.
- Cusick, M.F., Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2012). Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmune Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *42*, 102–111.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008a). Interleukin 4 inhibits TGF- $\beta$ -induced-Foxp3<sup>+</sup>T cells and generates, in combination with TGF- $\beta$ , Foxp3<sup>-</sup> effector T cells that produce interleukins 9 and 10. *Nat. Immunol.* *9*, 1347–1355.
- Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2008b). Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J. Autoimmun.* *31*, 252–256.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.
- Deane, K.D., Demoruelle, M.K., Kelmenson, L.B., Kuhn, K.A., Norris, J.M., and Holers, V.M. (2017). Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *31*, 3–18.
- Dianzani, U., Redoglia, V., Bragardo, M., Attisano, C., Bianchi, A., Di Franco, D., Ramenghi, U., Wolff, H., Thompson, L.F., and Pileri, A. (1993). Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 3961–3970.
- Dinesh, P., and Rasool, M. Multifaceted role of IL-21 in rheumatoid arthritis: Current understanding and future perspectives. *J. Cell. Physiol.* *233*, 3918–3928.
- Doherty, G.A., Bai, A., Hanidziar, D., Longhi, M.S., Lawlor, G.O., Putheti, P., Csizmadia, E., Nowak, M., Cheifetz, A.S., Moss, A.C., et al. (2012). CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Immunol.* *42*, 3062–3072.
- Dong, C. (2008). Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 337–348.
- Dougados, M., Soubrier, M., Antunez, A., Balint, P., Balsa, A., Buch, M., Casado, G., Detert, J., El-zorkany, B., Emery, P., et al. (2013). Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Ann. Rheum. Dis.* [annrheumdis-2013-204223](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204223).
- Duffin, K.C., Freeny, I.C., Schrodi, S.J., Wong, B., Feng, B.-J., Soltani-Arabshahi, R., Rakkhit, T., Goldgar, D.E., and Krueger, G.G. (2009). Association between IL13 Polymorphisms and Psoriatic Arthritis Is Modified by Smoking. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 2777–2783.

Duhen, T., and Campbell, D.J. (2014). IL-1 $\beta$  Promotes the Differentiation of Polyfunctional Human CCR6+CXCR3+ Th1/17 Cells That Are Specific for Pathogenic and Commensal Microbes. *J. Immunol.* *193*, 120–129.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 857–863.

Duhen, T., Duhen, R., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Campbell, D.J. (2012). Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* *119*, 4430–4440.

Dwyer, K.M., Hanidziar, D., Putheti, P., Hill, P.A., Pommey, S., McRae, J.L., Winterhalter, A., Doherty, G., Deaglio, S., Koulmanda, M., et al. (2010). Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *10*, 2410–2420.

Ehrentraut, H., Westrich, J.A., Eltzschig, H.K., and Clambey, E.T. (2012). Adora2b Adenosine Receptor Engagement Enhances Regulatory T Cell Abundance during Endotoxin-Induced Pulmonary Inflammation. *PLoS ONE* *7*.

Eichin, D., Laurila, J.P., Jalkanen, S., and Salmi, M. (2015). CD73 Activity is Dispensable for the Polarization of M2 Macrophages. *PLOS ONE* *10*, e0134721.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., et al. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* *461*, 282–286.

Ellyard, J.I., Simson, L., and Parish, C.R. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* *70*, 1–11.

Eltzschig, H.K., Abdulla, P., Hoffman, E., Hamilton, K.E., Daniels, D., Schönfeld, C., Löffler, M., Reyes, G., Duszenko, M., Karhausen, J., et al. (2005). HIF-1–dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J. Exp. Med.* *202*, 1493–1505.

Eltzschig, H.K., MacManus, C.F., and Colgan, S.P. (2008). Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: Functional consequences at the vascular interface. *Trends Cardiovasc. Med.* *18*, 103–107.

Eltzschig, H.K., Köhler, D., Eckle, T., Kong, T., Robson, S.C., and Colgan, S.P. (2009). Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood* *113*, 224–232.

Elyaman, W., Bradshaw, E.M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renaud, J.-C., et al. (2009). IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12885–12890.

Emery, P., Vencovský, J., Sylwestrzak, A., Leszczyński, P., Porawska, W., Baranauskaite, A., Tseluyko, V., Zhdan, V.M., Stasiuk, B., Milasiene, R., et al. (2015). A phase III randomised, double-blind, parallel-

group study comparing SB4 with etanercept reference product in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann. Rheum. Dis.* annrheumdis-2015-207588.

Etique, N., Grillier-Vuissoz, I., Lecomte, J., and Flament, S. (2009). Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Rep.* *21*, 977–981.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* *119*, 3573–3585.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 1206–1212.

Farahnik, B., Beroukhim, K., Nakamura, M., Abrouk, M., Zhu, T.H., Singh, R., Lee, K., Bhutani, T., and Koo, J. (2016). Anti-IL-17 Agents for Psoriasis: A Review of Phase III Data. *J. Drugs Dermatol.* *JDD 15*, 311–316.

Farber, D.L., Yudanin, N.A., and Restifo, N.P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 24–35.

Fausther, M., Pelletier, J., Ribeiro, C.M., Sévigny, J., and Picher, M. (2010). Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *298*, L804–L818.

Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* *156*, 5–7.

Fergusson, J.R., Smith, K.E., Fleming, V.M., Rajoriya, N., Newell, E.W., Simmons, R., Marchi, E., Björkander, S., Kang, Y.-H., Swadling, L., et al. (2014). CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Cell Rep.* *9*, 1075–1088.

Fernández, D., Flores-Santibáñez, F., Neira, J., Osorio-Barrios, F., Tejón, G., Nuñez, S., Hidalgo, Y., Fuenzalida, M.J., Meza, D., Ureta, G., et al. (2016). Purinergic Signaling as a Regulator of Th17 Cell Plasticity. *PLoS ONE* *11*.

Figueiró, F., de Oliveira, C.P., Bergamin, L.S., Rockenbach, L., Mendes, F.B., Jandrey, E.H.F., Moritz, C.E.J., Pettenuzzo, L.F., Sévigny, J., Guterres, S.S., et al. (2016). Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. *Purinergic Signal.* *12*, 303–312.

Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis.

Fischer Jens A. A., Hueber Axel J., Wilson Stacy, Galm Margarete, Baum Wolfgang, Kitson Christopher, Auer Johannes, Lorenz Stefan H., Moelleken Jörg, Bader Martin, et al. (2014). Combined Inhibition of

Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin-17 As a Therapeutic Opportunity in Rheumatoid Arthritis: Development and Characterization of a Novel Bispecific Antibody. *Arthritis Rheumatol.* 67, 51–62.

FitzGerald, O., and Dougados, M. (2006). Psoriatic arthritis: One or more diseases? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20, 435–450.

FitzGerald, O., Haroon, M., Giles, J.T., and Winchester, R. (2015). Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Res. Ther.* 17, 115.

Flores-Santibáñez, F., Fernández, D., Meza, D., Tejón, G., Vargas, L., Varela-Nallar, L., Arredondo, S., Guixé, V., Roseblatt, M., Bono, M.R., et al. (2015). CD73-mediated adenosine production promotes stem cell-like properties in mouse Tc17 cells. *Immunology* 146, 582–594.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.

Francois, V., Shehade, H., Acolty, V., Preyat, N., Delrée, P., Moser, M., and Oldenhove, G. (2015). Intestinal immunopathology is associated with decreased CD73-generated adenosine during lethal infection. *Mucosal Immunol.* 8, 773–784.

Fraser, J.H., Rincón, M., McCoy, K.D., and Le Gros, G. (1999). CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 838–844.

Fredholm, B.B., Chern, Y., Franco, R., and Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog. Neurobiol.* 83, 263–276.

Fucikova, J., Kralikova, P., Fialova, A., Brtnicky, T., Rob, L., Bartunkova, J., and Spísek, R. (2011). Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* 71, 4821–4833.

Gao, X., Zhu, Y., Li, G., Huang, H., Zhang, G., Wang, F., Sun, J., Yang, Q., Zhang, X., and Lu, B. (2012). TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. *PLOS ONE* 7, e30676.

Geginat, J., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Cytokine-driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory CD4+ T Cells. *J. Exp. Med.* 194, 1711–1720.

Gessi, S., Cattabriga, E., Avitabile, A., Gafa', R., Lanza, G., Cavazzini, L., Bianchi, N., Gambari, R., Feo, C., Liboni, A., et al. (2004). Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 5895–5901.

Giblett, E., Anderson, J., Cohen, F., Pollara, B., and Meuwissen, H. (1972). ADENOSINE-DEAMINASE DEFICIENCY IN TWO PATIENTS WITH SEVERELY IMPAIRED CELLULAR IMMUNITY. *The Lancet* 300, 1067–1069.

Gibson, D.J., Elliott, L., McDermott, E., Tosetto, M., Keegan, D., Byrne, K., Martin, S.T., Rispen, T., Cullen, G., Mulcahy, H.E., et al. (2015). Heightened Expression of CD39 by Regulatory T Lymphocytes

Is Associated with Therapeutic Remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 2806–2814.

Gicquel, T., Robert, S., Loyer, P., Victoni, T., Bodin, A., Ribault, C., Gleonnec, F., Couillin, I., Boichot, E., and Lagente, V. (2015). IL-1 $\beta$  production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *29*, 4162–4173.

Gladman, D.D. (2015). Clinical Features and Diagnostic Considerations in Psoriatic Arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *41*, 569–579.

Gladman, D.D., Antoni, C., Mease, P., Clegg, D.O., and Nash, P. (2005). Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann. Rheum. Dis.* *64 Suppl 2*, ii14-17.

Gladman, D.D., Mease, P.J., Choy, E.H., Ritchlin, C.T., Perdok, R.J., and Sasso, E.H. (2010). Risk factors for radiographic progression in psoriatic arthritis: subanalysis of the randomized controlled trial ADEPT. *Arthritis Res. Ther.* *12*, R113.

Glocova, I., Brück, J., Geisel, J., Müller-Hermelink, E., Widmaier, K., Yazdi, A.S., Röcken, M., and Ghoreschi, K. (2017). Induction of skin-pathogenic Th22 cells by epicutaneous allergen exposure. *J. Dermatol. Sci.* *87*, 268–277.

Gorini, S., Callegari, G., Romagnoli, G., Mammi, C., Mavilio, D., Rosano, G., Fini, M., Virgilio, F.D., Gulinelli, S., Falzoni, S., et al. (2010). ATP secreted by endothelial cells blocks CX3CL1-elicited natural killer cell chemotaxis and cytotoxicity via P2Y11 receptor activation. *Blood* *116*, 4492–4500.

Gourdin, N., Bossennec, M., Rodriguez, C., Vigano, S., Machon, C., Jandus, C., Bauché, D., Faget, J., Durand, I., Chopin, N., et al. (2018). Autocrine Adenosine regulates tumor polyfunctional CD73+CD4+ effector T cells devoid of immune checkpoints. *Cancer Res.*

Gran, B., Zhang, G.-X., Yu, S., Li, J., Chen, X.-H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-Deficient Mice Are Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Evidence for Redundancy in the IL-12 System in the Induction of Central Nervous System Autoimmune Demyelination. *J. Immunol.* *169*, 7104–7110.

Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., and Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF- $\beta$ –TGF- $\beta$  receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10878–10883.

Griffiths, C.E., and Barker, J.N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet* *370*, 263–271.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 1097–1101.

Gruber, H.E., Hoffer, M.E., McAllister, D.R., Laikind, P.K., Lane, T.A., Schmid-Schoenbein, G.W., and Engler, R.L. (1989). Increased adenosine concentration in blood from ischemic myocardium by AICA riboside. Effects on flow, granulocytes, and injury. *Circulation* *80*, 1400–1411.

Gupta, P.K., Godec, J., Wolski, D., Adland, E., Yates, K., Pauken, K.E., Cosgrove, C., Ledderose, C., Junger, W.G., Robson, S.C., et al. (2015). CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLOS Pathog.* *11*, e1005177.

H Clevers, B Alarcon, T Wileman, and Terhorst, and C. (1988). The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* *6*, 629–662.

Haider, A.S., Lowes, M.A., Suárez-Fariñas, M., Zaba, L.C., Cardinale, I., Khatcherian, A., Novitskaya, I., Wittkowski, K.M., and Krueger, J.G. (2008). Identification of cellular pathways of “type 1,” Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 1913–1920.

Hakemi, M.G., Ghaedi, K., Andalib, A., Hosseini, M., and Rezaei, A. (2011). Optimization of human Th17 cell differentiation in vitro<Emphasis Type="Italic">:</Emphasis> evaluating different polarizing factors. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* *47*, 581.

van Hamburg, J.P., and Tas, S.W. (2018). Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* *87*, 69–81.

Hamidzadeh, K., and Mosser, D.M. (2016). Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. *Front. Immunol.* *7*.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* *6*, 1123–1132.

Häusler, S.F.M., Barrio, I.M. del, Strohschein, J., Chandran, P.A., Engel, J.B., Hönig, A., Ossadnik, M., Horn, E., Fischer, B., Krockenberger, M., et al. (2011). Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol. Immunother.* *60*, 1405.

Hayashida, M., Kawano, H., Nakano, T., Shiraki, K., and Suzuki, A. (2000). Cell death induction by CTL: perforin/granzyme B system dominantly acts for cell death induction in human hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *225*, 143–150.

Hegewisch-Becker, S., Staib, F., Löning, T., Pichlmeier, U., Kröger, N., Reymann, A., and Hossfeld, D.K. (1998). No evidence of significant activity of the multidrug resistance gene product in primary human breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *9*, 85–93.

Herrath, J., Chemin, K., Albrecht, I., Catrina, A.I., and Malmström, V. (2014). Surface expression of CD39 identifies an enriched Treg-cell subset in the rheumatic joint, which does not suppress IL-17A secretion. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2979–2989.

Heuts, D.P.H.M., Weissenborn, M.J., Olkhov, R.V., Shaw, A.M., Gummadova, J., Levy, C., and Scrutton, N.S. (2012). Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *13*, 2384–2391.

- Hofer, S., Ivarsson, L., Stoitzner, P., Auffinger, M., Romani, N., Heufler, C., and Rainer, C. (2003). Adenosine Slows Migration of Dendritic Cells but Does Not Affect Other Aspects of Dendritic Cell Maturation. *J. Invest. Dermatol.* *121*, 300–307.
- Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V., and Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* *237*, 123–130.
- Hot, A., Zrioual, S., Lenief, V., and Miossec, P. (2012). IL-17 and tumour necrosis factor  $\alpha$  combination induces a HIF-1 $\alpha$ -dependent invasive phenotype in synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1393–1401.
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* *21*, 503–513.
- Hughes-Austin, J.M., Deane, K.D., Derber, L.A., Kolfenbach, J.R., Zerbe, G.O., Sokolove, J., Lahey, L.J., Weisman, M.H., Buckner, J.H., Mikuls, T.R., et al. (2013). Multiple cytokines and chemokines are associated with rheumatoid arthritis-related autoimmunity in first-degree relatives without rheumatoid arthritis: Studies of the Aetiology of Rheumatoid Arthritis (SERA). *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 901–907.
- Humphreys, B.D., Rice, J., Kertesz, S.B., and Dubyak, G.R. (2000). Stress-activated Protein Kinase/JNK Activation and Apoptotic Induction by the Macrophage P2X7 Nucleotide Receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 26792–26798.
- Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. (2001). Unique Chemotactic Response Profile and Specific Expression of Chemokine Receptors Ccr4 and Ccr8 by Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells. *J. Exp. Med.* *194*, 847–854.
- Inoue, E., Yamanaka, H., Hara, M., Tomatsu, T., and Kamatani, N. (2007). Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 407–409.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H., and Nozawa-Inoue, K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.* *63*, 17–31.
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *J. Immunol.* *183*, 7169–7177.
- Jandl, K., and Heinemann, A. (2017). The therapeutic potential of CRTH2/DP2 beyond allergy and asthma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *133*, 42–48.
- Jiang, Z.G., Wu, Y., Csizmadia, E., Feldbrügge, L., Enyoji, K., Tigges, J., Toxavidis, V., Stephan, H., Müller, C.E., McKnight, C.J., et al. (2014). Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ecto-nucleotidases in human plasma. *Purinergic Signal.* *10*, 611–618.
- Johnston, A., Gudjonsson, J.E., Sigmundsdottir, H., Runar Ludviksson, B., and Valdimarsson, H. (2005). The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin. Immunol.* *114*, 154–163.

- Joller, N., Lozano, E., Burkett, P.R., Patel, B., Xiao, S., Zhu, C., Xia, J., Tan, T.G., Sefik, E., Yajnik, V., et al. (2014). Treg cells expressing the co-inhibitory molecule TIGIT selectively inhibit pro-inflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* 40, 569–581.
- Joosten, S.A., and Ottenhoff, T.H.M. (2008). Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum. Immunol.* 69, 760–770.
- Jr, D.R., Hackett, M., Wong, J., Kimball, A.B., Cohen, R., Bala, M., and Group, for the I.S. (2006). Co-occurrence and comorbidities in patients with immune-mediated inflammatory disorders: an exploration using US healthcare claims data, 2001–2002. *Curr. Med. Res. Opin.* 22, 989–1000.
- Kalsi, K., Lawson, C., Dominguez, M., Taylor, P., Yacoub, M.H., and Smolenski, R.T. (2002). Regulation of ecto-5'-nucleotidase by TNF-alpha in human endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 232, 113–119.
- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261, 466–469.
- Karczewski, J., Dobrowolska, A., Rychlewska-Hańczewska, A., and Adamski, Z. (2016). New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmunity* 49, 435–450.
- Kavanaugh, A., Fleischmann, R.M., Emery, P., Kupper, H., Redden, L., Guerette, B., Santra, S., and Smolen, J.S. (2013). Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 64–71.
- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., and Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon- $\gamma$ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 390–402.
- Khakh, B.S., and Burnstock, G. (2009). THE DOUBLE LIFE OF ATP. *Sci. Am.* 301, 84–92.
- King, A.E., Ackley, M.A., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S.A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 416–425.
- Kiss, J., Yegutkin, G.G., Koskinen, K., Savunen, T., Jalkanen, S., and Salmi, M. (2007). IFN-beta protects from vascular leakage via up-regulation of CD73. *Eur. J. Immunol.* 37, 3334–3338.
- Kjaergaard, J., Hatfield, S., Jones, G., Ohta, A., and Sitkovsky, M. (2018). A2A Adenosine Receptor Gene Deletion or Synthetic A2A Antagonist Liberate Tumor-Reactive CD8+ T Cells from Tumor-Induced Immunosuppression. *J. Immunol.* ji1700850.
- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., et al. (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 54, 38–46.



- Kleinschek, M.A., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E.E., Turner, S.P., Raskin, L., Desai, B., Faubion, W.A., de Waal Malefyt, R., et al. (2009). Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* *206*, 525–534.
- Kmieciak, M., Gowda, M., Graham, L., Godder, K., Bear, H.D., Marincola, F.M., and Manjili, M.H. (2009). Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J. Transl. Med.* *7*, 89.
- Koppelman, B., Neefjes, J.J., de Vries, J.E., and de Waal Malefyt, R. (1997). Interleukin-10 Down-Regulates MHC Class II  $\alpha\beta$  Peptide Complexes at the Plasma Membrane of Monocytes by Affecting Arrival and Recycling. *Immunity* *7*, 861–871.
- Korb, A., Pavenstädt, H., and Pap, T. (2009). Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *14*, 447–454.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., et al. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* *103*, 1345–1352.
- Kramer, I., Wibulswas, A., Croft, D., and Genot, E. (2003). Rheumatoid arthritis: targeting the proliferative fibroblasts. *Prog. Cell Cycle Res.* *5*, 59–70.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., et al. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* *114*, 1141–1149.
- Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., van Assema, F.B.J., Coyle, A.J., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2006). Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2472–2482.
- Kumar, B.V., Connors, T.J., and Farber, D.L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* *48*, 202–213.
- Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., and Hoffmann, I. (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J. Cell Sci.* *111 ( Pt 16)*, 2445–2453.
- Lan, C., Huang, X., Lin, S., Huang, H., Cai, Q., Lu, J., and Liu, J. (2013). High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res.* *352*, 351–359.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564–569.
- Lanfranca, M.P., Kryczek, I., Rhim, A., Girgis, A., Lazarus, J., Magliano, M.P.D., Zou, W., and Frankel, T. (2017). IL-22 Promotes Pancreatic Cancer Tumorigenesis through Induction of Stemness and Epithelial to Mesenchymal Transition. *J. Immunol.* *198*, 66.22-66.22.

- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *201*, 233–240.
- Lapa, F. da R., Júnior, S.J.M., LuizCerutti, M., and Santos, A.R.S. (2014). Pharmacology of Adenosine Receptors and Their Signaling Role in Immunity and Inflammation. *Pharmacol. Ther.*
- Lappas, C.M., Rieger, J.M., and Linden, J. (2005). A2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- $\gamma$  Production in Murine CD4+ T Cells. *J. Immunol.* *174*, 1073–1080.
- Lawson, C.A., Brown, A.K., Bejarano, V., Douglas, S.H., Burgoyne, C.H., Greenstein, A.S., Boylston, A.W., Emery, P., Ponchel, F., and Isaacs, J.D. (2006). Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *45*, 1210–1217.
- Leclerc, B.G., Charlebois, R., Chouinard, G., Allard, B., Pommey, S., Saad, F., and Stagg, J. (2016). CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* *22*, 158–166.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* *13*, 991–999.
- Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnäker, E.-M., Tarner, I.H., Robbins, P.D., et al. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* *15*, 1414–1420.
- Leonard, F., Devaux, Y., Vausort, M., Ernens, I., Rolland-Turner, M., and Wagner, D.R. (2011). Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of Flt-1. *J. Leukoc. Biol.* *90*, 199–204.
- Lévesque, S.A., Kukulski, F., Enjyoji, K., Robson, S.C., and Sévigny, J. (2010). NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1473–1485.
- Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* *203*, 2271–2279.
- Liao, H., Hyman, M.C., Baek, A.E., Fukase, K., and Pinsky, D.J. (2010). cAMP/CREB-mediated Transcriptional Regulation of Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (CD39) Expression. *J. Biol. Chem.* *285*, 14791–14805.
- Lindqvist, A., Källström, H., and Karlsson Rosenthal, C. (2004). Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress. *J. Cell Sci.* *117*, 4979–4990.
- Link, A.A., Kino, T., Worth, J.A., McGuire, J.L., Crane, M.L., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., and Elenkov, I.J. (2000). Ligand-Activation of the Adenosine A2a Receptors Inhibits IL-12 Production by Human Monocytes. *J. Immunol.* *164*, 436–442.

- Linnemann, C., Schildberg, F.A., Schurich, A., Diehl, L., Hegenbarth, S.I., Endl, E., Lacher, S., Müller, C.E., Frey, J., Simeoni, L., et al. (2009). Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology* *128*, e728–e737.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., and Damle, N.K. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *176*, 1595–1604.
- Lo Nigro, C., Monteverde, M., Lee, S., Lattanzio, L., Vivenza, D., Comino, A., Syed, N., McHugh, A., Wang, H., Proby, C., et al. (2012). NT5E CpG island methylation is a favourable breast cancer biomarker. *Br. J. Cancer* *107*, 75–83.
- Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K.E., Sprent, J., Culley, F.J., Johansson, C., and Openshaw, P.J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.* *5*, 161–172.
- Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P.A., Darcy, P.K., Smyth, M.J., and Stagg, J. (2013). CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 11091–11096.
- Longhi, M.S., Moss, A., Bai, A., Wu, Y., Huang, H., Cheifetz, A., Quintana, F.J., and Robson, S.C. (2014). Characterization of Human CD39<sup>+</sup> Th17 Cells with Suppressor Activity and Modulation in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* *9*.
- López-Bravo, M., Escalera, M.M. de la, Domínguez, P.M., González-Cintado, L., Fresno, C. del, Martín, P., Hoyo, G.M. del, and Ardavín, C. (2013). IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 1409–1419.e13.
- Lorvik, K.B., Hammarstrom, C., Fauskanger, M., Haabeth, O.A.W., Zangani, M., Haraldsen, G., Bogen, B., and Corthay, A. (2016). Adoptive transfer of tumor-specific Th2 cells eradicates tumors by triggering an in situ inflammatory immune response. *Cancer Res.* canres.1219.2016.
- Lowes, M.A., Russell, C.B., Martin, D.A., Towne, J.E., and Krueger, J.G. (2013). The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends Immunol.* *34*, 174–181.
- Lu, X.-X., Chen, Y.-T., Feng, B., Mao, X.-B., Yu, B., and Chu, X.-Y. (2013). Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *WJG* *19*, 1912–1918.
- Lupia, M., Angiolini, F., Bertalot, G., Freddi, S., Sachsenmeier, K.F., Chisci, E., Kutryb-Zajac, B., Confalonieri, S., Smolenski, R.T., Giovannoni, R., et al. (2018). CD73 Regulates Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer-Initiating Cells. *Stem Cell Rep.* *10*, 1412–1425.
- Ma, L., Xue, H.-B., Guan, X.-H., Shu, C.-M., Zhang, J.-H., and Yu, J. (2014a). Possible pathogenic role of T helper type 9 cells and interleukin (IL)-9 in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* *175*, 25–31.

- Ma, Q., Li, D., Carreño, R., Patenia, R., Tsai, K.Y., Xydes-Smith, M., Alousi, A.M., Champlin, R.E., Sale, G.E., and Afshar-Kharghan, V. (2014b). Complement component C3 mediates Th1/Th17 polarization in human T-cell activation and cutaneous GVHD. *Bone Marrow Transplant.* *49*, 972–976.
- Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S.R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J.P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., et al. (2013a). Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity* *38*, 729–741.
- Ma, Y., Adjemian, S., Yang, H., Catani, J.P.P., Hannani, D., Martins, I., Michaud, M., Kepp, O., Sukkurwala, A.Q., Vacchelli, E., et al. (2013b). ATP-dependent recruitment, survival and differentiation of dendritic cell precursors in the tumor bed after anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* *2*.
- MacKenzie, W.M., Hoskin, D.W., and Blay, J. (2002). Adenosine Suppresses  $\alpha 4\beta 7$  Integrin-Mediated Adhesion of T Lymphocytes to Colon Adenocarcinoma Cells. *Exp. Cell Res.* *276*, 90–100.
- Madi, L., Ochaion, A., Rath-Wolfson, L., Bar-Yehuda, S., Erlanger, A., Ohana, G., Harish, A., Merimski, O., Barer, F., and Fishman, P. (2004). The A3 Adenosine Receptor Is Highly Expressed in Tumor versus Normal Cells: Potential Target for Tumor Growth Inhibition. *Clin. Cancer Res.* *10*, 4472–4479.
- Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S.Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M.K., et al. (2010). CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2174–2181.
- Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Caterina Rossi, M., Querci, V., Mazzoni, A., Cimaz, R., De Palma, R., Liotta, F., Maggi, E., et al. (2012). Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* *42*.
- Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M., and Hayashi, Y. (2015). IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int. Immunol.* *27*, 131–141.
- Malefyt, R. de W., Yssel, H., and Vries, J.E. de (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* *150*, 4754–4765.
- Maliszewski, C.R., Delespesse, G.J., Schoenborn, M.A., Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., and Birks, C. (1994). The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* *153*, 3574–3583.
- Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E.K., Gorelik, E., and Whiteside, T.L. (2010). Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 7176–7186.
- Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ T. *Nat. Immunol.* *9*, 641–649.

- Mann, E.H., Chambers, E.S., Chen, Y.-H., Richards, D.F., and Hawrylowicz, C.M. (2015).  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> acts via transforming growth factor- $\beta$  to up-regulate expression of immunosuppressive CD73 on human CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells. *Immunology* *146*, 423–431.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- Marijnissen, R.J., Roeleveld, D.M., Young, D., Nickerson-Nutter, C., Abdollahi-Roodsaz, S., Garcia de Aquino, S., van de Loo, F.A.J., van Spruiel, A.B., Boots, A.M.H., van den Berg, W.B., et al. (2014). Interleukin-21 receptor deficiency increases the initial toll-like receptor 2 response but protects against joint pathology by reducing Th1 and Th17 cells during streptococcal cell wall arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *66*, 886–895.
- Marteau, F., Gonzalez, N.S., Communi, D., Goldman, M., Boeynaems, J.-M., and Communi, D. (2005). Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood* *106*, 3860–3866.
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* *31*, 787–798.
- Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Vieira, S.M., Burns, E.J., Patel, B., Sloma, I., Wu, Y., Mayo, L., Ben-Hamo, R., Efroni, S., et al. (2013). Interleukin-27 acts on dendritic cells to suppress the T-cell response and autoimmunity by inducing the expression of ENTPD1 (CD39). *Nat. Immunol.* *14*, 1054–1063.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T<sub>H</sub>-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* *8*, 1390–1397.
- Meaden, E.R., Hoggard, P.G., Khoo, S.H., and Back, D.J. (2002). Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J. Immunol. Methods* *262*, 159–165.
- Melani, A., De Micheli, E., Pinna, G., Alfieri, A., Corte, L.D., and Pedata, F. (2003). Adenosine extracellular levels in human brain gliomas: an intraoperative microdialysis study. *Neurosci. Lett.* *346*, 93–96.
- Meller, S., Di Domizio, J., Voo, K.S., Friedrich, H.C., Chamilos, G., Ganguly, D., Conrad, C., Gregorio, J., Le Roy, D., Roger, T., et al. (2015). T<sub>H</sub>17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* *16*, 970–979.
- Menon, B., Gullick, N.J., Walter, G.J., Rajasekhar, M., Garrood, T., Evans, H.G., Taams, L.S., and Kirkham, B.W. (2014). Interleukin-17+CD8<sup>+</sup> T Cells Are Enriched in the Joints of Patients With Psoriatic Arthritis and Correlate With Disease Activity and Joint Damage Progression. *Arthritis Rheumatol. Hoboken Nj* *66*, 1272–1281.

Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S.R., Voorhees, A.S.V., Leonardi, C.L., Gordon, K.B., Lebwohl, M., Koo, J.Y.M., Elmets, C.A., Korman, N.J., et al. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J. Am. Acad. Dermatol.* *58*, 826–850.

Merighi, S., Varani, K., Gessi, S., Cattabriga, E., Iannotta, V., Ulouglu, C., Leung, E., and Borea, P.A. (2001). Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line. *Br. J. Pharmacol.* *134*, 1215–1226.

Minguet, S., Huber, M., Rosenkranz, L., Schamel, W.W.A., Reth, M., and Brummer, T. (2005). Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.* *35*, 31–41.

Mirza, A., Basso, A., Black, S., Malkowski, M., Kwee, L., Pachter, J.A., Lachowicz, J.E., Wang, Y., and Liu, S. (2005). RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 1355–1360.

Mitra, A., Raychaudhuri, S.K., and Raychaudhuri, S.P. (2012). Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R65.

Mittal, S.K., and Roche, P.A. (2015). Suppression of Antigen Presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* *34*, 22–27.

Moncrieffe, H., Nistala, K., Kamhieh, Y., Evans, J., Eddaoudi, A., Eaton, S., and Wedderburn, L.R. (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.

Monteiro, I., Vigano, S., Faouzi, M., Treilleux, I., Michielin, O., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., Romero, P., and de Leval, L. (2018). CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma. *Oncotarget* *9*, 26659–26669.

Moon, Y.J., Zhang, S., and Morris, M.E. (2007). Real-time quantitative polymerase chain reaction for BCRP, MDR1, and MRP1 mRNA levels in lymphocytes and monocytes. *Acta Haematol.* *118*, 169–175.

Mor, A., Abramson, S.B., and Pillinger, M.H. (2005). The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *115*, 118–128.

Morello, S., Capone, M., Sorrentino, C., Giannarelli, D., Madonna, G., Mallardo, D., Grimaldi, A.M., Pinto, A., and Ascierto, P.A. (2017). Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *J. Transl. Med.* *15*.

Morita, T., Shima, Y., Wing, J.B., Sakaguchi, S., Ogata, A., and Kumanogoh, A. (2016). The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* *11*, e0162306.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1987). Two types of mouse helper T-cell clone Implications for immune regulation. *Immunol. Today* *8*, 223–227.

- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J.D., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. (1999). A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin  $\alpha\beta6$  Binds and Activates Latent TGF  $\beta1$ . *Cell* *96*, 319–328.
- Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., et al. (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* *112*, 362–373.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 933–944.
- Murray, P.J. (2005). The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 8686–8691.
- Mustelin, T., Coggeshall, K.M., Isakov, N., and Altman, A. (1990). T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* *247*, 1584–1587.
- Nag, B., Wada, H.G., Passmore, D., Clark, B.R., Sharma, S.D., and McConnell, H.M. (1993). Purified beta-chain of MHC class II binds to CD4 molecules on transfected HeLa cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *150*, 1358–1364.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice. *J. Immunol.* *171*, 6173–6177.
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., and Strober, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 834–842.
- Nanzer, A.M., Chambers, E.S., Ryanna, K., Richards, D.F., Black, C., Timms, P.M., Martineau, A.R., Griffiths, C.J., Corrigan, C.J., and Hawrylowicz, C.M. (2013). Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in a glucocorticoid-independent fashion. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 297–304.e3.
- Neilsen, C.V., and Bryce, P.J. (2010). IL-13 directly promotes esophagus production of CCL11 and CCL24 and the migration of eosinophils. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *40*, 427–434.
- Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A.B., Opitz, B., van der Meer, J.H.M., van de Veerdonk, F.L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood* *113*, 2324–2335.
- Nevedomskaya, E., Perryman, R., Solanki, S., Syed, N., Mayboroda, O.A., and Keun, H.C. (2016). A Systems Oncology Approach Identifies NT5E as a Key Metabolic Regulator in Tumor Cells and Modulator of Platinum Sensitivity. *J. Proteome Res.* *15*, 280–290.

- Niemelä, J., Henttinen, T., Yegutkin, G.G., Airas, L., Kujari, A.-M., Rajala, P., and Jalkanen, S. (2004). IFN- $\alpha$  Induced Adenosine Production on the Endothelium: A Mechanism Mediated by CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase) Up-Regulation. *J. Immunol.* *172*, 1646–1653.
- Nikolova, M., Carriere, M., Jenabian, M.-A., Limou, S., Younas, M., Kök, A., Huë, S., Seddiki, N., Hulin, A., Delaneau, O., et al. (2011). CD39/Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression. *PLOS Pathog.* *7*, e1002110.
- Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* *127*, 759–767.
- Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., Jager, W. de, Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14751–14756.
- Noble, A., Mehta, H., Lovell, A., Papaioannou, E., and Fairbanks, L. (2016). IL-12 and IL-4 activate a CD39-dependent intrinsic peripheral tolerance mechanism in CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1438–1448.
- Novitskiy, S.V., Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A.E., Huang, Y., Tikhomirov, O.Y., Blackburn, M.R., Biaggioni, I., Carbone, D.P., Feoktistov, I., et al. (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* *112*, 1822–1831.
- Novitskiy, S.V., Pickup, M.W., Gorska, A.E., Owens, P., Chytil, A., Aakre, M., Wu, H., Shyr, Y., and Moses, H.L. (2011). TGF- $\beta$  Receptor II Loss Promotes Mammary Carcinoma Progression by Th17 Dependent Mechanisms. *Cancer Discov.* *1*, 430–441.
- Ohta, A., Kini, R., Ohta, A., Subramanian, M., Madasu, M., and Sitkovsky, M. (2012). The development and immunosuppressive functions of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front. Immunol.* *3*.
- de Oliveira, M. de F.S.P., Rocha, B. de O., and Duarte, G.V. (2015). Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *An. Bras. Dermatol.* *90*, 9–20.
- Osterfeld, H., Ahrens, R., Strait, R., Finkelman, F.D., Renauld, J.-C., and Hogan, S.P. (2010). Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 469–476.e2.
- Palazón, A., Martínez-Forero, I., Teijeira, A., Morales-Kastresana, A., Alfaro, C., Sanmamed, M.F., Perez-Gracia, J.L., Peñuelas, I., Hervás-Stubbs, S., Rouzaut, A., et al. (2012). The HIF-1 $\alpha$  hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. *Cancer Discov.* *2*, 608–623.
- Pandolfi, J.B., Ferraro, A.A., Sananez, I., Gancedo, M.C., Baz, P., Billordo, L.A., Fainboim, L., and Arruvito, L. (2016). ATP-Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity. *J. Immunol.* *196*, 3287–3296.



- Panjehpour, M., and Karami-Tehrani, F. (2004). An adenosine analog (IB-MECA) inhibits anchorage-dependent cell growth of various human breast cancer cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1502–1509.
- Panjehpour, M., and Karami-Tehrani, F. (2007). Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. *Oncol. Res.* *16*, 575–585.
- Panther, E., Corinti, S., Idzko, M., Herouy, Y., Napp, M., Sala, A. la, Girolomoni, G., and Norgauer, J. (2003). Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* *101*, 3985–3990.
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M.P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A.A., and Romagnani, S. (1991). Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 4538–4542.
- Paul, B.J., Kandy, H.I., and Krishnan, V. (2017). Pre-rheumatoid arthritis and its prevention. *Eur. J. Rheumatol.* *4*, 161–165.
- Paustian, C., Taylor, P., Johnson, T., Xu, M., Ramirez, N., Rosenthal, K.S., Shu, S., Cohen, P.A., Czerniecki, B.J., and Koski, G.K. (2013). Extracellular ATP and Toll-Like Receptor 2 Agonists Trigger in Human Monocytes an Activation Program That Favors T Helper 17. *PLoS ONE* *8*.
- Peres, R.S., Liew, F.Y., Talbot, J., Carregaro, V., Oliveira, R.D., Almeida, S.L., França, R.F.O., Donate, P.B., Pinto, L.G., Ferreira, F.I.S., et al. (2015). Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 2509–2514.
- Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.-A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., et al. (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* *206*, 1465–1472.
- Pinhal-Enfield, G., Ramanathan, M., Hasko, G., Vogel, S.N., Salzman, A.L., Boons, G.-J., and Leibovich, S.J. (2003). An Angiogenic Switch in Macrophages Involving Synergy between Toll-Like Receptors 2, 4, 7, and 9 and Adenosine A2A Receptors. *Am. J. Pathol.* *163*, 711–721.
- Plank, M., Kaiko, G., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H., Wei, S., Wilson, M., Durum, S., and Foster, P. (2017). Th22 cells develop independently of the Th17 lineage with unique transcriptional properties and plasticity toward Th1-type cells during Influenza infection. *Eur. Respir. J.* *50*, PA1146.
- Prakken, B., Wehrens, E., and Wijk, F. van (2013). Editorial: Quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *65*, 552–554.
- Prevoo, M.L., van 't Hof, M.A., Kuper, H.H., van Leeuwen, M.A., van de Putte, L.B., and van Riel, P.L. (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *38*, 44–48.

- Prinz, J.C. (2001). Psoriasis vulgaris – a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin. Exp. Dermatol.* *26*, 326–332.
- Prinz, J.C. (2004). Disease mimicry—a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry? *Autoimmun. Rev.* *3*, 10–15.
- Purvis, H.A., Stoop, J.N., Mann, J., Woods, S., Kozijn, A.E., Hambleton, S., Robinson, J.H., Isaacs, J.D., Anderson, A.E., and Hilkens, C.M.U. (2010). Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* *116*, 4829–4837.
- Ramesh, R., Kozhaya, L., McKevitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., and Sundrud, M.S. (2014). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J. Exp. Med.* *211*, 89–104.
- Raskovalova, T., Lokshin, A., Huang, X., Jackson, E.K., and Gorelik, E. (2006). Adenosine-mediated inhibition of cytotoxic activity and cytokine production by IL-2/NKp46-activated NK cells: involvement of protein kinase A isozyme I (PKA I). *Immunol. Res.* *36*, 91–99.
- Raskovalova, T., Lokshin, A., Huang, X., Su, Y., Mandic, M., Zarour, H.M., Jackson, E.K., and Gorelik, E. (2007). Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res.* *67*, 5949–5956.
- Raychaudhuri, S., Sandor, C., Stahl, E.A., Freudenberg, J., Lee, H.-S., Jia, X., Alfredsson, L., Padyukov, L., Klareskog, L., Worthington, J., et al. (2012a). Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* *44*, 291–296.
- Raychaudhuri, S.K., Saxena, A., and Raychaudhuri, S.P. (2015). Role of IL-17 in the pathogenesis of psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis. *Clin. Rheumatol.* *34*, 1019–1023.
- Raychaudhuri, S.P., Raychaudhuri, S.K., and Genovese, M.C. (2012b). IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis. *Mol. Cell. Biochem.* *359*, 419–429.
- Regateiro, F.S., Howie, D., Nolan, K.F., Agorogiannis, E.I., Greaves, D.R., Cobbold, S.P., and Waldmann, H. (2011). Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* *41*, 2955–2965.
- Reinhardt, J., Landsberg, J., Schmid-Burgk, J.L., Ramis, B.B., Bald, T., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Young, A., Ngiow, S.F., Nettersheim, D., et al. (2017). MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer Res.*
- Resta, R., Yamashita, Y., and Thompson, L.F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol. Rev.* *161*, 95–109.
- Rissiek, A., Baumann, I., Cuapio, A., Mautner, A., Kolster, M., Arck, P.C., Dodge-Khatami, A., Mittrücker, H.-W., Koch-Nolte, F., Haag, F., et al. (2015). The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J. Autoimmun.* *58*, 12–20.

- Ritchlin, C.T., and Krueger, J.G. (2016). New Therapies for Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *28*, 204–210.
- Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Cortesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E., and Rufer, N. (2007). Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes. *J. Immunol.* *178*, 4112–4119.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* *182*, 68–79.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2480–2488.
- Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* *42*, 607–612.
- Roussel, L., Houle, F., Chan, C., Yao, Y., Bérubé, J., Olivenstein, R., Martin, J.G., Huot, J., Hamid, Q., Ferri, L., et al. (2010). IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 4531–4537.
- Sadej, R., and Skladanowski, A.C. (2012). Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim. Pol.* *59*, 647–652.
- Sáez, P.J., Vargas, P., Shoji, K.F., Harcha, P.A., Lennon-Duménil, A.-M., and Sáez, J.C. (2017). ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X7 receptors. *Sci. Signal.* *10*.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* *155*, 1151–1164.
- Sakaki, H., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y., and Kojima, S. (2013). Autocrine Regulation of Macrophage Activation via Exocytosis of ATP and Activation of P2Y11 Receptor. *PloS One* *8*, e59778.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.
- Santegoets, S.J.A.M., van den Eertwegh, A.J.M., van de Loosdrecht, A.A., Scheper, R.J., and de Gruijl, T.D. (2008). Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 1364–1373.
- Saze, Z., Schuler, P.J., Hong, C.-S., Cheng, D., Jackson, E.K., and Whiteside, T.L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* *122*, 9–18.
- Schena, F., Volpi, S., Faliti, C.E., Penco, F., Santi, S., Proietti, M., Schenk, U., Damonte, G., Salis, A., Bellotti, M., et al. (2013). Dependence of Immunoglobulin Class Switch Recombination in B Cells on Vesicular Release of ATP and CD73 Ectonucleotidase Activity. *Cell Rep.* *3*, 1824–1831.

- Schenk, U., Frascoli, M., Proietti, M., Geffers, R., Traggiai, E., Buer, J., Ricordi, C., Westendorf, A.M., and Grassi, F. (2011). ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci. Signal.* 4, ra12.
- Schlapbach, C., Gehad, A., Yang, C., Watanabe, R., Guenova, E., Teague, J.E., Campbell, L., Yawalkar, N., Kupper, T.S., and Clark, R.A. (2014). Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci. Transl. Med.* 6, 219ra8.
- Schnurr, M., Toy, T., Stoitzner, P., Cameron, P., Shin, A., Beecroft, T., Davis, I.D., Cebon, J., and Maraskovsky, E. (2003). ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* 102, 613–620.
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., Davis, I.D., Cebon, J., and Maraskovsky, E. (2004). Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 103, 1391–1397.
- Schwiebert, E.M., and Zsembery, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1615, 7–32.
- Shimato, S., Maier, L.M., Maier, R., Bruce, J.N., Anderson, R.C., and Anderson, D.E. (2012). Profound tumor-specific Th2 bias in patients with malignant glioma. *BMC Cancer* 12, 561.
- Simoni, Y., Becht, E., Fehlings, M., Loh, C.Y., Koo, S.-L., Teng, K.W.W., Yeong, J.P.S., Nahar, R., Zhang, T., Kared, H., et al. (2018). Bystander CD8 + T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* 557, 575–579.
- Singh, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Hedrick, M.N., and Farber, J.M. (2008). Human T Cells That Are Able to Produce IL-17 Express the Chemokine Receptor CCR6. *J. Immunol.* 180, 214–221.
- Singh, T.P., Schön, M.P., Wallbrecht, K., Gruber-Wackernagel, A., Wang, X.-J., and Wolf, P. (2013). Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. *PloS One* 8, e51752.
- Singh Jasvinder A., Saag Kenneth G., Bridges S. Louis, Akl Elie A., Bannuru Raveendhara R., Sullivan Matthew C., Vaysbrot Elizaveta, McNaughton Christine, Osani Mikala, Shmerling Robert H., et al. (2015). 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 68, 1–26.
- Sismanopoulos, N., Delivanis, D.A., Alysandratos, K.D., Angelidou, A., Vasiadi, M., Therianou, A., and Theoharides, T.C. (2012). IL-9 Induces VEGF Secretion from Human Mast Cells and IL-9/IL-9 Receptor Genes Are Overexpressed in Atopic Dermatitis. *PLoS ONE* 7.
- Spychala, J., Lazarowski, E., Ostapkowicz, A., Ayscue, L.H., Jin, A., and Mitchell, B.S. (2004). Role of Estrogen Receptor in the Regulation of Ecto-5'-Nucleotidase and Adenosine in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 708–717.
- Stagg, J., Beavis, P.A., Divisekera, U., Liu, M.C.P., Möller, A., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2012). CD73-Deficient Mice Are Resistant to Carcinogenesis. *Cancer Res.* 72, 2190–2196.

- Stritesky, G.L., Yeh, N., and Kaplan, M.H. (2008). IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 5948–5955.
- Strohmeier, G.R., Lencer, W.I., Patapoff, T.W., Thompson, L.F., Carlson, S.L., Moe, S.J., Carnes, D.K., Mrsny, R.J., and Madara, J.L. (1997). Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* *99*, 2588–2601.
- Sutton, N.R., Petrovic-Djergovic, D., Baek, A., Kanthi, Y., Liao, H., Visovatti, S.H., and Pinsky, D.J. (2013). Abstract 550: Differential Regulation of CD39 Expression by IL-1 $\beta$  in Leukocytes and Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, A550–A550.
- Suzuki, E., Mellins, E.D., Gershwin, M.E., Nestle, F.O., and Adamopoulos, I.E. (2014). The IL-23/IL-17 Axis in Psoriatic Arthritis. *Autoimmun. Rev.* *13*, 496–502.
- Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F., and Colgan, S.P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* *110*, 993–1002.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* *100*, 655–669.
- Tabibzadeh, S.S., Satyaswaroop, P.G., and Rao, P.N. (1988). Antiproliferative effect of interferon-gamma in human endometrial epithelial cells in vitro: potential local growth modulatory role in endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *67*, 131–138.
- Taga, K., Mostowski, H., and Tosato, G. (1993). Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* *81*, 2964–2971.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+ Cd4+ Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J. Exp. Med.* *192*, 303–310.
- Tamasauskiene, L., and Sitkauskiene, B. (2017). Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: Pro-inflammatory or anti-inflammatory effect? *Pediatr. Neonatol.*
- Tan, E.Y., Richard, C.L., Zhang, H., Hoskin, D.W., and Blay, J. (2006). Adenosine downregulates DPPIV on HT-29 colon cancer cells by stimulating protein tyrosine phosphatase(s) and reducing ERK1/2 activity via a novel pathway. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *291*, C433–C444.
- Tang, Y., Jiang, L., Zheng, Y., Ni, B., and Wu, Y. (2012). Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol.* *13*, 17.
- Telfer, N.R., Chalmers, R.J., Whale, K., and Colman, G. (1992). The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch. Dermatol.* *128*, 39–42.
- Temann, U.A., Geba, G.P., Rankin, J.A., and Flavell, R.A. (1998). Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* *188*, 1307–1320.

- Thibaudin, M., Chaix, M., Boidot, R., Végran, F., Derangère, V., Limagne, E., Berger, H., Ladoire, S., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2015). Human ectonucleotidase-expressing CD25<sup>high</sup> Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. *Oncoimmunology* 5.
- Thompson, L.F., Ruedi, J.M., Glass, A., Low, M.G., and Lucas, A.H. (1989). Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. *J. Immunol.* 143, 1815–1821.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor Effector Function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific. *J. Immunol.* 164, 183–190.
- Tóth, I., Le, A.Q., Hartjen, P., Thomssen, A., Matzat, V., Lehmann, C., Scheurich, C., Beisel, C., Busch, P., Degen, O., et al. (2013). Decreased frequency of CD73<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells of HIV-infected patients correlates with immune activation and T cell exhaustion. *J. Leukoc. Biol.* 94, 551–561.
- Trabanelli, S., Očadlíková, D., Gulinelli, S., Curti, A., Salvestrini, V., Vieira, R. de P., Idzko, M., Virgilio, F.D., Ferrari, D., and Lemoli, R.M. (2012). Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation. *J. Immunol.* 189, 1303–1310.
- Tran, D.Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D., and Shevach, E.M. (2009). GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- $\beta$  on platelets and activated FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13445–13450.
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T<sub>H</sub>-17, T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells. *Nat. Immunol.* 10, 864–871.
- Tsuji-Takayama, K., Suzuki, M., Yamamoto, M., Harashima, A., Okochi, A., Otani, T., Inoue, T., Sugimoto, A., Motoda, R., Yamasaki, F., et al. (2008). IL-2 activation of STAT5 enhances production of IL-10 from human cytotoxic regulatory T cells, HOZOT. *Exp. Hematol.* 36, 181–192.
- Tuomela, S., Salo, V., Tripathi, S.K., Chen, Z., Laurila, K., Gupta, B., Äijö, T., Oikari, L., Stockinger, B., Lähdesmäki, H., et al. (2012). Identification of early gene expression changes during human Th17 cell differentiation. *Blood* 119, e151–e160.
- Turcotte, M., Spring, K., Pommey, S., Chouinard, G., Cousineau, I., George, J., Chen, G.M., Gendoo, D.M.A., Haibe-Kains, B., Karn, T., et al. (2015). CD73 Is Associated with Poor Prognosis in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 75, 4494–4503.
- Turcotte, M., Allard, D., Mittal, D., Bareche, Y., Buisseret, L., José, V., Pommey, S., Delisle, V., Loi, S., Joensuu, H., et al. (2017). CD73 Promotes Resistance to HER2/ErbB2 Antibody Therapy. *Cancer Res.* 77, 5652–5663.
- Turtle, C.J., Swanson, H.M., Fujii, N., Estey, E.H., and Riddell, S.R. (2009). A Distinct Subset of Self-Renewing Human Memory CD8<sup>+</sup> T Cells Survives Cytotoxic Chemotherapy. *Immunity* 31, 834–844.
- Unutmaz, D. (2009). RORC2: The master of human Th17 cell programming. *Eur. J. Immunol.* 39, 1452–1455.

Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18, 415–428.

Veale, D.J. (2013). Psoriatic arthritis: recent progress in pathophysiology and drug development. *Arthritis Res. Ther.* 15, 224.

Végran, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2015). Th9 Cells: A Novel CD4 T-cell Subset in the Immune War against Cancer. *Cancer Res.* 75, 475–479.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.

Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O’Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* 206, 43–49.

Vétizou, M., Pitt, J.M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350, 1079–1084.

Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., et al. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342, 971–976.

Vinapamula, K.S., Pemmaraju, S.V.L.N., Bhattaram, S.K., Bitla, A.R., and Manohar, S.M. (2015). Serum Adenosine Deaminase as Inflammatory Marker in Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* 9, BC08-BC10.

Voigt, C., May, P., Gottschlich, A., Markota, A., Wenk, D., Gerlach, I., Voigt, S., Stathopoulos, G.T., Arendt, K.A.M., Heise, C., et al. (2017). Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 12994–12999.

Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupé, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T<sub>H</sub>-17 responses. *Nat. Immunol.* 9, 650–657.

Wall, L., Burke, F., Barton, C., Smyth, J., and Balkwill, F. (2003). IFN- $\gamma$  Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells in Vivo and in Vitro. *Clin. Cancer Res.* 9, 2487–2496.

Wang, C.M., Ploia, C., Anselmi, F., Sarukhan, A., and Viola, A. (2014). Adenosine triphosphate acts as a paracrine signaling molecule to reduce the motility of T cells. *EMBO J.* 33, 1354–1364.

Wang, H., Lee, S., Nigro, C.L., Lattanzio, L., Merlano, M., Monteverde, M., Matin, R., Purdie, K., Mladkova, N., Bergamaschi, D., et al. (2012). NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br. J. Cancer* 106, 1446–1452.

- Wehrens, E.J., Mijnheer, G., Duurland, C.L., Klein, M., Meerding, J., van Loosdregt, J., de Jager, W., Sawitzki, B., Coffey, P.J., Vastert, B., et al. (2011). Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood* 118, 3538–3548.
- Weiner, H.L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182, 207–214.
- Welte, T., and Zhang, X.H.-F. (2015). Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm.* 2015.
- Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., and Miller, L.S. (2010). The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 6413–6419.
- Wilkin, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J.-M., and Robaye, B. (2001). The P2Y11 Receptor Mediates the ATP-Induced Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 166, 7172–7177.
- Wilson, C.B., Rowell, E., and Sekimata, M. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 91–105.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., et al. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8, 950–957.
- Xu, P.A., and Kellems, R.E. (2000). Function of Murine Adenosine Deaminase in the Gastrointestinal Tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 749–757.
- Xu, Z., Ho, S., Chang, C.-C., Zhang, Q.-Y., Vasilescu, E.-R., Vlad, G., and Suci-Foca, N. (2016). Molecular and Cellular Characterization of Human CD8 T Suppressor Cells. *Front. Immunol.* 7.
- Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature* 454, 350–352.
- Yanguas Crespo, S., Willebrords, J., Johnstone, S.R., Maes, M., Decrock, E., De Bock, M., Leybaert, L., Cogliati, B., and Vinken, M. (2017). Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 51–61.
- Yasuda, Y., Saito, M., Yamamura, T., Yaguchi, T., and Nishizaki, T. (2009). Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors. *J. Gastroenterol.* 44, 56–65.
- Ye, J., Livergood, R.S., and Peng, G. (2013). The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am. J. Pathol.* 182, 10–20.
- Ye, P., Garvey, P.B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W.R., Schwarzenberger, P., Shellito, J.E., and Kolls, J.K. (2001). Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 335–340.



- Yegutkin, G.G., Wieringa, B., Robson, S.C., and 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. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 3875–3883.
- Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., Ferrari, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2009). Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J.* *23*, 1685–1693.
- Yoshida, O., Kimura, S., Jackson, E.K., Robson, S.C., Geller, D.A., Murase, N., and Thomson, A.W. (2013). CD39 expression by hepatic myeloid dendritic cells attenuates inflammation in liver transplant ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. *58*.
- Younas, M., Hue, S., Lacabaratz, C., Guguin, A., Wiedemann, A., Surenaud, M., Beq, S., Croughs, T., Lelièvre, J.-D., and Lévy, Y. (2013). IL-7 Modulates In Vitro and In Vivo Human Memory T Regulatory Cell Functions through the CD39/ATP Axis. *J. Immunol.* *191*, 3161–3168.
- Yu, Q., Sharma, A., Oh, S.Y., Moon, H.-G., Hossain, M.Z., Salay, T.M., Leeds, K.E., Du, H., Wu, B., Waterman, M.L., et al. (2009). T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon- $\gamma$ . *Nat. Immunol.* *10*, 992–999.
- Yuan, Q., Bromley, S.K., Means, T.K., Jones, K.J., Hayashi, F., Bhan, A.K., and Luster, A.D. (2007). CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* *204*, 1327–1334.
- Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N.J., Abello, M.V., Novitskaya, I., Pierson, K.C., Gonzalez, J., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 79–88.
- Zachariae, H. (2003). Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. *Am. J. Clin. Dermatol.* *4*, 441–447.
- Zanin, R.F., Braganhol, E., Bergamin, L.S., Campesato, L.F.I., Filho, A.Z., Moreira, J.C.F., Morrone, F.B., Sévigny, J., Schetinger, M.R.C., Wyse, A.T. de S., et al. (2012). Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'-Nucleotidase. *PLOS ONE* *7*, e31205.
- Zemmour, D., Zilionis, R., Kiner, E., Klein, A.M., Mathis, D., and Benoist, C. (2018). Single-cell gene expression reveals a landscape of regulatory T cell phenotypes shaped by the TCR. *Nat. Immunol.* *19*, 291–301.
- Zhang, J.-P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.-H., Chen, M.-S., Li, L., Wu, C., Li, S.-P., and Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J. Hepatology*. *50*, 980–989.
- Zhang, P., Su, D.-M., Liang, M., and Fu, J. (2008). Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis. *Mol. Immunol.* *45*, 1470–1476.

- Zhang, X., Zhang, D., Jia, H., Feng, Q., Wang, D., Liang, D., Wu, X., Li, J., Tang, L., Li, Y., et al. (2015). The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* 21, 895–905.
- Zhong, X., Malhotra, R., Woodruff, R., and Guidotti, G. (2001). Mammalian Plasma Membrane Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1, CD39, Is Not Active Intracellularly THE N-GLYCOSYLATION STATE OF CD39 CORRELATES WITH SURFACE ACTIVITY AND LOCALIZATION. *J. Biol. Chem.* 276, 41518–41525.
- Zhou, J.Z., Riquelme, M.A., Gao, X., Ellies, L.G., Sun, L.-Z., and Jiang, J.X. (2015). Differential Impact of Adenosine Nucleotides Released by Osteocytes on Breast Cancer Growth and Bone Metastasis. *Oncogene* 34, 1831–1842.
- Zhou, Q., Yan, J., Putheti, P., Wu, Y., Sun, X., Toxavidis, V., Tigges, J., Kassam, N., Enjyoji, K., Robson, S.C., et al. (2009). Isolated CD39 Expression on CD4+ T Cells Denotes both Regulatory and Memory Populations. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2303–2311.
- Zhu, X., Mulcahy, L.A., Mohammed, R.A., Lee, A.H., Franks, H.A., Kilpatrick, L., Yilmazer, A., Paish, E.C., Ellis, I.O., Patel, P.M., et al. (2008). IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. BCR* 10, R95.
- Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human T<sub>H</sub>17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 484, 514–518.
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Viaud, S., Vétizou, M., Daillère, R., Merad, M., and Kroemer, G. (2015). Cancer and the gut microbiota: An unexpected link. *Sci. Transl. Med.* 7, 271ps1.