



HAL
open science

Rôle des récepteurs purinergiques P2X7 et d'apoptose Fas dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement des maladies auto-immunes.

Amine Mellouk

► **To cite this version:**

Amine Mellouk. Rôle des récepteurs purinergiques P2X7 et d'apoptose Fas dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement des maladies auto-immunes.. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS221 . tel-03505869

HAL Id: tel-03505869

<https://theses.hal.science/tel-03505869v1>

Submitted on 1 Jan 2022

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.

Rôle des Récepteurs purinergiques P2X7 et d'apoptose Fas dans l'Homéostasie des lymphocytes T et le Développement des maladies auto-immunes

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'UMR 1174 INSERM-Université Paris-Sud

École doctorale n°568, signalisations et réseaux intégratifs en biologie
« BIOSIGNE »
Spécialité de doctorat : Immunologie

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 16 juillet 2018, par

Amine Mellouk

Composition du Jury :

Dr. Bruno Lucas

Directeur de Recherche,
Institut Cochin (CNRS UMR8104)

Rapporteur

Dr. Géraldine Schlecht-Louf

Maître de conférences des universités,
Université Paris-Sud (INSERM UMR 996)

Examinatrice

Dr. Nadine Varin-Blank

Directrice de Recherche,
Université Paris 13 (INSERM UMR 978)

Présidente

Dr. Nicolas Bidère

Chargé de recherche,
Université de Nantes (INSERM U1232– Unité de recherche)

Rapporteur

Pr. Xavier Mariette

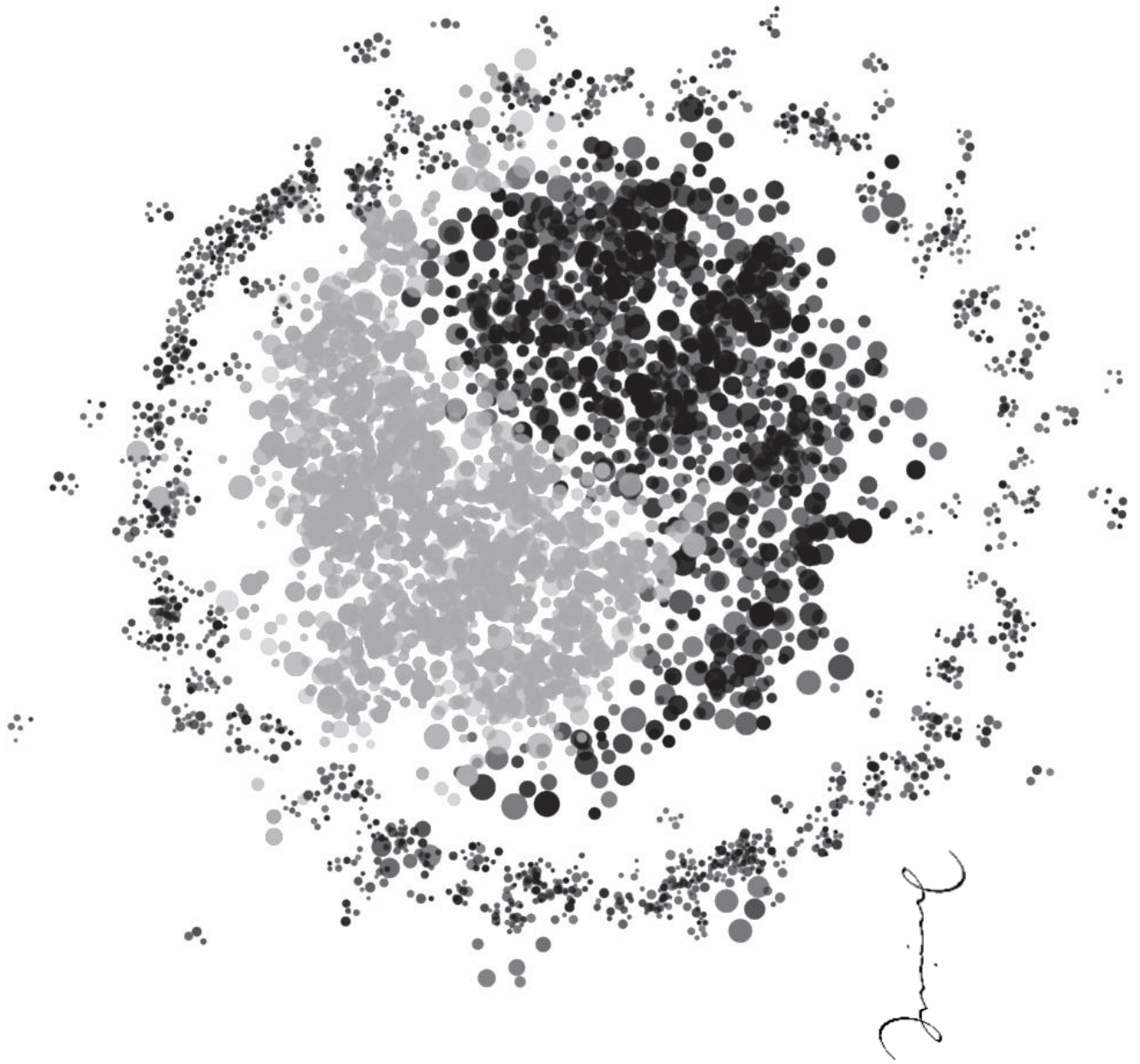
Professeur des universités-praticien hospitalier
Université Paris-Sud (INSERM Unité 1184)

Examineur

Pr. Pierre Bobé

Professeur des universités,
Université Paris-Sud (INSERM UMR 1174)

Directeur de thèse



T cell homeostasis

Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et gratitude envers les l'ensemble des membres de jury. Je remercie Madame Nadine Varin-Blank qui me fait l'honneur de présider la soutenance de thèse, Monsieur Bruno Lucas et Monsieur Nicolas Bidère d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail de thèse ainsi que Madame Géraldine Schelcht-Louf et Monsieur Xavier Mariette de l'avoir examiné.

J'adresse mes premiers remerciements à mon directeur de thèse, Pierre Bobé. Pierre, Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté. Tu m'as ouvert énormément d'opportunités et accordé une carte blanche intellectuelle et matérielle afin de mener à bien mes expériences tout en ayant le privilège de bénéficier de tes précieux conseils, ton immense expérience et tes lumineuses orientations. Je te remercie également pour tout ce que tu m'as transmis, à commencer par les bases d'immunologie (depuis les cours de master), en passant par ton savoir-faire très divers et complexe : réponse immunitaire, auto-immunité, génétique, biologie moléculaire, valorisation et innovation thérapeutique... ainsi que pleines d'autres passions : le français, la philosophie, l'art, la musique et parfois même le sport ou la spiritualité.

Un grand merci aux doctorants et étudiants avec qui j'ai eu la chance de travailler sur le même projet ; à Hanaa Safya de m'avoir initié à de nombreuses techniques de laboratoire ainsi qu'à de délicieux plats libanais, à Vanessa Da Paz pour sa simplicité et bonne humeur et enfin à Tom Hutteau pour sa disponibilité, son aide et son esprit critique. Je remercie également Julie Langlois pour sa précieuse contribution lors de ses passages au laboratoire.

Je remercie toutes les équipes de recherche, avec qui nous avons collaboré, pour leur professionnalisme, disponibilité, qualité de travail et de discussion :

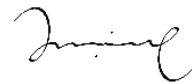
- le Pr. Karim Benihoud avec qui nous avons mené les études de la réponse immunitaire anti-adénovirus et les analyses histologiques des modèles animaux. Je remercie également toute son équipe notamment Aleksandra Anchim et Linda Ramdani.
- le Pr. Jean Kanellopoulos de nous avoir fait profiter son immense culture scientifique et ses précieux conseils. Nous collaborons très étroitement avec le laboratoire du Pr. Kanellopoulos notamment pour le développement : de nouveaux modèles de souris transgéniques déficientes conditionnellement pour des récepteurs purinergiques, des anticorps monoclonaux spécifiques aux isoformes des récepteurs P2X7 ainsi que lors de l'étude transcriptomique des modèles de souris lupique.
- le Dr. Olivier Dellis et son Victor pour son aide et disponibilité lors des expériences de flux calcique dans les lignées cellulaires.
- les Pr. Korgn Ea et Dr. Laure Campillo, avec qui nous avons travaillé sur l'implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome des macrophages au cours de l'ostéoarthrose.
- le Dr. Mickael Bourge, Ingénieur de Recherche responsable de la plateforme de cytométrie Imagif, et sa « Batmobile » Astrios qui m'ont accompagné tout au long de la thèse.
- le Dr. Éric Jaquet, responsable de la plateforme de QPCR d'Imagif, pour son efficacité et son professionnalisme.
- je remercie également Peggy Sanatine pour son aide à la plateforme de cytométrie du Généthon à Evry.
- je remercie Isabelle Garcin pour son aide lors des expériences d'imagerie confocale (PS : j'envie ta culture cinématographique).

- je remercie énormément Mesdames Nadia lafrate, Pascale Béchu et Mathilde Geurts pour leurs précieuses aides lors de mes démarches administratives parfois très complexes.
- merci aux Dr. Michel Le Poivre, Olivier Guittet et Amal Rayah pour leurs conseils, critiques et discussions lors des présentations du journal club.
- un grand merci tous les membres de l'unité d'accueil Inserm UMR-1174 : Le directeur, le Dr. Laurent Combettes et notre chef d'équipe, le Dr. Thierry Tordjmann pour leur accueil au sein de l'unité. Je remercie également notre gestionnaire Claudine Lapierre pour son aide.
- un énorme merci à tous les chercheurs, ingénieurs, techniciens, postdoctorants, doctorants, animaliers et étudiants pour leurs bienveillance, bonne humeur, sourires et pour avoir partagé, au quotidien, leurs passions et centres d'intérêts lors d'échanges scientifiques, culturels, sportifs et bien d'autres choses transformant ces années en un souvenir très chaleureux : Ali Tebbi, Aurore Besnard, Brigitte Grosse, Camille Le Gilcher, Florent Cauchois, Gregory Merlen, Isabelle Doignon, Isabelle Garcin, Elodie Hudik, Julien Gautherot, Latifa Bouzahir, Laure Villemain, Leila Bouchab, Marion Almes, Mathilde Glénisson, Mauricette Collado, Nicolas Kahale, Noémie Péan, Ongoly Okiemy, Oliver Nüss, Olivier Dellis, Olivier Fayol, Rachida Amzal, Sophie Dupré, Sylviane Boucherie, Velesca Jourdainne, Yu Xiang Song, Zahra Tanfin et Zhimin Song.

À mes collègues et amis des équipes pédagogiques de physiologie animale et d'immunologie : Alexandra, Amina, Cécile, Charlotte, Géraldine, Heather, Hervé, Laura, Laurence, Mathis, Micaela, Romain, Séverine, Simon et Solal

Un grand merci à mes meilleurs potes, Rafik, Samir et Aimeric pour leur présence, conseils et soutien. Je remercie énormément Ibtissem, Meriem, Ziane, Mamia et et Meriem et Jamel pour leurs encouragements. Je remercie Melissa pour sa précieuse présence lors des moments difficiles. Je remercie Chayma pour les raccourcis clavier des espaces et des traits d'unions insécables.

Enfin, un remerciement spécial à mes parents " *Yemma w 'Ba* ", ma sœur Meryem et mes frères Assam, Youcef et Hamid pour leur amour inconditionnel et soutien perpétuel.



Sommaire

I. Table des matières

Remerciements	2
Sommaire	4
I. Table des matières	4
.I Tables des illustrations	9
.I.1 Figures	9
.I.2 Tableaux	10
Abréviations	11
Résumé	13
Introduction	14
I. Développement et maturation des lymphocytes T	15
.I.1 Recrutement et maturation des progéniteurs lymphoïdes dans le thymus	15
.I.2 Sélections thymiques	16
.I.2.a Sélection positive	16
.I.2.b Sélection négative	17
.I.2.c Autres sous-populations lymphocytaires T produites dans le thymus	19
.I.2.c.1 Développement des lymphocytes T régulateurs	19
.I.2.c.2 Développement des lymphocytes NKT	20
.I.2.c.3 Développement des lymphocytes T $\gamma\delta$	22
.I.2.c.4 Développement des lymphocytes T intraépithéliaux CD8 $\alpha\alpha$	22
.I.2.c.5 Mucosal-Associated Invariant T cells	23
.II Lymphocytes T $\alpha\beta$ du stade naïf au stade mémoire	23
.II.1 Circulation et homing des lymphocytes T	23
.II.2 Réponse immunitaire des lymphocytes T	25
.II.2.a Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques	25
.II.2.b Expansion clonale des lymphocytes T	27
.II.2.c Différenciation et fonctions des lymphocytes T effecteurs	29
.II.2.c.1 Différenciation et fonctions des lymphocytes T cytotoxiques	29

.II.2.c.1.1	Lymphocytes T cytotoxiques CD8 ⁺	29
.II.2.c.1.2	Lymphocytes T cytotoxiques CD4 ⁺	30
.II.2.c.2	Différenciation et fonctions des lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou iTreg	30
.II.2.c.3	Fonctions des lymphocytes Th1	32
.II.2.c.4	Fonctions des lymphocytes Th2	33
.II.2.c.5	Fonctions des lymphocytes Th17	34
.II.2.d	Molécules de costimulation dans la différenciation des lymphocytes T	35
.II.2.d.1	Molécules de costimulation ICOS/ICOSL	35
.II.2.d.2	Molécules de costimulation OX-40/OX-40L	36
.II.3	Régulation de la réponse immunitaire	37
.II.3.a	Lymphocytes T régulateurs CD4 ⁺	37
.II.3.b	Cellules dendritiques tolérogènes	38
.II.4	Marqueurs phénotypiques dans la différenciation des lymphocytes T	39
.II.4.a	CD45RA/CD45RB et CCR7	39
.II.4.b	CD62L	40
.II.4.c	CD44	40
.II.4.d	CD127 et KLRG1	40
.II.5	Phénotype des lymphocytes T effecteurs	41
.II.6	Phénotype des lymphocytes T mémoires	42
.II.7	Phénotype des lymphocytes T résidants mémoires	43
.II.8	Phénotype des lymphocytes T exhausted	43
.III	Apoptose et homéostasie des lymphocytes T	43
.III.1	Voie intrinsèque Bim	44
.III.2	Voie extrinsèque Fas/FasL	46
.III.3	Élimination des lymphocytes apoptotiques par les macrophages	49
.IV	Récepteur P2X7	50
.IV.1	Les récepteurs purinergiques	51
.IV.2	Récepteurs P2X	51
.IV.2.a	Structure des P2XR	51
.IV.2.b	Fonctions des récepteurs P2X	54
.IV.2.c	Sensibilité des P2XR à leur ligand	54
.IV.2.d	Distribution tissulaire des récepteurs P2X	54
.IV.3	Structure et fonctions du récepteur P2X7	55
.IV.3.a	Fonctions cellulaires de P2X7R	56

.IV.3.b	Isoformes du récepteur P2X7	57
.IV.3.c	Récepteur P2X7 et système immunitaire	59
.IV.3.c.1	Maturation et sécrétion des cytokines	59
.IV.3.c.2	Activation et différenciation des lymphocytes T	60
.IV.3.c.3	Clivage de la molécule de homing L-sélectine/ CD62L	61
.IV.3.c.4	Sensibilité des sous-populations lymphocytaires T à l'ATP	61
.V	Lymphocytes T et lupus	62
.V.1	Souris MRL/lpr	62
.V.2	Lymphocytes T DN B220 ⁺	63
.V.2.a	Origine CTL des lymphocytes T DN B220 ⁺	65
.V.2.b	Fonctions régulatrices des lymphocytes T DN B220 ⁺	65
.V.2.c	Phénotype EMRA des lymphocytes T DN B220 ⁺	65
.V.3	Le récepteur P2X7 et auto-immunité	66
.V.4	Quelques loci de susceptibilité liés au lupus	67
.V.4.a	Dérégulations des mécanismes responsables du contrôle de la mort cellulaire	67
.V.4.b	Phagocytose et élimination des corps apoptotiques	69
.V.4.c	Dérégulation de l'autophagie	69
.V.4.d	Défauts de régulation et de tolérance	69
.V.4.d.1	Facteur de transcription Foxp3	69
.V.4.d.2	Molécule de co-inhibition CTLA-4	69
.V.4.d.3	Facteurs de transcription AIRE et Fezf2	70
.V.4.e	NETose et lupus	71
.V.4.f	Autoanticorps et lupus	71
.V.4.g	Cytokines et lupus	73
.V.4.g.1	Interférons de type I et de type II	73
.V.4.g.2	Cytokines pro-inflammatoires	73
.V.4.g.3	Cytokines immuno-régulatrices	74
	Objectifs	76
	Articles	78
.I	Variations in cellular responses of mouse T cells to ATP stimulation do not depend on P2X7 receptor expression levels but on their activation and differentiation stage	79
.I.1	Résumé	79
.I.2	Figures supplémentaires	94

.II	CD8⁺ but not CD4⁺ effector/memory T cells express the CD44^{high}CD45RB^{high} phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses	97
	Résumé	97
.III	A novel mouse model of autoimmune and lymphoproliferative syndrome reveals a synergistic role of death receptor Fas and purinergic receptor P2X7 in T cell homeostasis	132
	Résumé	132
	Résultats complémentaires	178
.I	Matériel et méthodes	178
.I.1	Lignées et culture cellulaire	178
.I.2	Analyses par cytométrie en flux des fonctions cellulaires induites par P2X7R	178
.I.3	Analyses par cytométrie en flux des phénotypes cellulaires	179
.I.4	Analyses par cytométrie en flux de la phosphorylation des MAP kinases	179
.I.5	Analyses par cytométrie en flux des taux de caspases 8 activées	180
.I.6	Analyse des flux calciques par spectrofluorométrie	180
.I.7	Analyses par RT-PCR des isoformes de P2X7R exprimées dans les lignées cellulaires	181
.I.8	Lignées de souris	181
.I.9	Analyses par RNAseq et RT-QPCR du transcriptome des lignées de souris	182
.I.9.a	RNAseq	182
.I.9.b	QPCR	182
.I.9.c	Extraction et control de la qualité des ARN	182
.I.9.d	Sélection des gènes de référence	183
.I.9.e	Calculs des quantités relatives	183
.I.10	Construction de lignées de souris déficientes pour P2X7R de façon conditionnelle	183
.II	Résultats	185
.II.1	Les lymphocytes T CD8 ⁺ sont plus résistants que les lymphocytes T CD4 ⁺ à la voie Fas/FasL au stade effecteur/mémoire	185
.II.2	Diminution des taux de cFLIP dans les lymphocytes T déficients en P2X7R	186
.II.3	Forte expression des ATPases CD73 sur les lymphocytes T pathogéniques DN B220 ⁺	187
.II.4	Fonctions cellulaires et taux d'expression de P2X7R dans les lignées cellulaires	188
.II.5	Absence d'anomalies dans l'expression P2X7R dans les lignées cellulaires	191
.II.5.a	Les lignées lymphocytaires T murines expriment les ARNm des isoformes P2X7 a et k192	
.II.6	Cinétique d'activation de la MAP kinase Erk par la voie ATP/P2X7R	192

.II.7	Analyse du transcriptome de la rate des souris déficientes pour P2X7R et/ou Fas	193
.II.8	Validation des gènes par QPCR et analyses fonctionnelles	195
.II.9	Caractérisation des souris B6-P2X7KO ^{Foxp3-Cre}	200
.II.9.a	Augmentation du nombre de lymphocytes Treg chez les souris B6-P2X7KO ^{Foxp3-Cre}	200
Discussion et Perspectives		203
Articles en annexe		213
.I	Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface	213
.I.1	Résumé	213
.I.2	Figures supplémentaires	230
.II	Calcium pyrophosphate dihydrate crystals induce IL-1beta production by monocytes through ATP release- and ROS production-dependent pathways – involvement of potassium efflux	233
Références Bibliographiques		234
Abstract		261

.I Tables des illustrations

.I.1 Figures

Figure 1 : Résumé des principales étapes de maturation des lymphocytes T dans le thymus	16
Figure 2 : Apprêtement des antigènes du soi dans les cTEC lors de la sélection positive	17
Figure 3 : Maturation des thymocytes	18
Figure 4 : La survie des thymocytes dépend de l'avidité du TCR pour les complexes peptide-CMH lors de la sélection négative.	19
Figure 5 : Maturation des lymphocytes T régulateurs dans le thymus	20
Figure 6 : Maturation des lymphocytes iNKT dans le thymus	21
Figure 7 : Homing des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires	24
Figure 8 : Molécules et ligands de costimulation et coinhibition exprimés par les DC et les lymphocytes T	26
Figure 9 : Rôle des voies TCR/CD28 et IL-2/IL-2R dans l'expansion clonale des lymphocytes T	28
Figure 10 : Rôle de Notch dans la différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2	32
Figure 11 : Différenciation et polarisation des lymphocytes T CD4 ⁺ en sous-populations effectrices	35
Figure 12 : Induction et fonctions du facteur de transcription Foxp3 spécifique des lymphocytes Treg	38
Figure 13 : Taux d'expression en CD45RA et CCR7 au cours de l'expansion clonale des lymphocytes T	39
Figure 14 : Rôle de CD44 dans la migration des lymphocytes T aux sites inflammatoires	40
Figure 15 : Évolution au cours du temps du nombre de lymphocytes T CD8 ⁺ spécifiques d'un peptide viral	44
Figure 16 : Étapes clés du maintien de l'homéostasie des lymphocytes T en réponse primaire et secondaire	46
Figure 17 : Mort cellulaire par les voies extrinsèque et intrinsèque	48
Figure 18 : Rôle de la phagocytose des corps apoptotiques dans le maintien de la tolérance	50
Figure 19 : Représentation schématique des récepteurs à l'ATP et aux adénosines de type P2	52
Figure 20 : Structure cristallographique du récepteur P2X4 du poisson zèbre	53
Figure 21 : Grande variabilité de taille de la queue C-terminale des récepteurs P2X	55
Figure 22 : Activités cellulaires induites par l'activation du P2X7R	56
Figure 23 : Isoformes connues de P2X7	58
Figure 24 : Rôle de P2X7R dans la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 par les cellules de l'immunité innée	59
Figure 25 : Rôle de P2X7R dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T	60
Figure 26 : P2X7R dans la migration des lymphocytes T	61
Figure 27 : Les souris MRL/lpr, un modèle spontané d'auto-immunité	63
Figure 28 : Perte de l'homéostasie des lymphocytes T en réponse secondaire lors de déficience en Fas ou FasL	64
Figure 29 : Loci de susceptibilité au LED chez l'Homme	68
Figure 30 : Rôle du récepteur CLTA-4 dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T	70
Figure 31 : Transgène utilisé pour produire des lignées de souris invalidées de façon conditionnelle pour P2X7R	184

Figure 32 : Mort cellulaire induite par la voie Fas dans les lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ effecteurs/mémoires	185
Figure 33 : Mort cellulaire induite par la voie Fas dans les lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ effecteurs/mémoires déficients ou non pour P2X7R	186
Figure 34 : Taux d'expression des récepteurs Fas à la surface des lymphocytes T des souris B6 et B6-P2X7KO	187
Figure 35 : Les lymphocytes T des souris lupiques et B6-P2X7KO âgées présentent des taux faibles en cFlip	187
Figure 36 : Taux d'expression des ecto-ATPases CD39 et CD73 à la surface des lymphocytes T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et DN B220 ⁺ des souris B6 déficientes pour Fas et/ou P2X7R.	188
Figure 37: Taux d'expression de P2X7R à la surface des lignées lymphocytaires T	189
Figure 38: Influx calcique induit par la voie ATP/P2X7R dans les lignées lymphocytaires T	190
Figure 39 : Externalisation des phosphatidylsérines et formation de pores non sélectifs dans les lignées lymphocytaires T en réponse à l'ATP	191
Figure 40 : Alignement des séquences des produits de PCR de l'exon 1 du p2rx7 (UTR 5') des lignées cellulaires	192
Figure 41 : Cinétique de phosphorylation de Erk1/2 par la voie ATP/P2X7R dans la lignée EL4	193
Figure 42 : Heatmap de l'analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de 36 gènes dans la rate de 35 souris individuelles	198
Figure 43 : « Heatmap » de l'analyse par RT-PCR quantitative de l'expression moyenne des 36 gènes dans la rate des souris des 7 groupes	199
Figure 44 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de P2X7R à la surface des lymphocytes Treg et Tconv des souris B6 ^{Foxp3-Cre} et B6-P2X7KO ^{Foxp3-Cre}	200
Figure 45 : Perte des fonctions cellulaires dépendantes de P2X7R dans les lymphocytes Treg des souris B6-P2X7KO ^{Foxp3-Cre}	201
Figure 46 : Proportion des lymphocytes Treg dans la rate des souris B6 ^{FoxP3} et B6-P2X7KO ^{FoxP3}	202

.1.2 Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques fonctionnelles des différentes sous-populations lymphocytaires T	36
Tableau 2: Taux d'expression des marqueurs d'activation ou de différenciation des lymphocytes T conventionnels	41
Tableau 3 : Distribution tissulaire et sensibilité in vitro à l'ATP des récepteurs P2X	55
Tableau 4 : Principales molécules de l'homéostasie des lymphocytes T et de la réponse immunitaire impliquées dans le développement de syndromes auto-immuns	75
Tableau 5 : Amorces utilisées pour amplifier et séquencer l'ADNc de p2x7r des différentes lignées lymphocytaires T	192
Tableau 6 : Nombre de gènes exprimés différemment dans la rate des 5 lignées de souris.	194
Tableau 7 : Liste des gènes analysés par QPCR et description brève des fonctions connues de leurs protéines	196

Abréviations

A :

ADAM : *A Disintegrin And Metalloproteinase*
ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNdb : ADN double brins
AhR : *Aryl hydrocarbon Receptor*
AICD : *Activation Induced Cell Death*
AIRE : *Autoimmune Regulator*
ALPS : *Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*
AP-1 : *Activator Protein 1*
APAF1 : *Apoptotic Protease-Activating Factor 1*

APECED : *Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*

APP : *Amyloid Precursor Protein*

ATG : *Autophagy Related Gene*

ATP : Adénosine TriPhosphate

C :

Ca : Calcium

CCR : *CC Chemokine Receptor*

CD : Cluster de Différenciation

CHAI : *CTLA-4 Haploinsufficiency with Autoimmune Infiltration*

CLP : Progéniteur des Cellules Lymphoïdes

CM : *Central Memory*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

Ct : *Cycle Threshold*

CTL : *Cytotoxic T Lymphocyte*

CTLA : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen*

cTEC : cellule Épithéliale du Cortex Thymique

D :

DAG : DiAcylGlycerol

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*

DC : Cellule Dendritique

DD : *Death Domain*

DED : *Death Effector Domain*

DISC : *Death Inducing Signaling Complex*

DLL : *Delta Like Ligand*

DN : Double Négatif CD4⁻CD8⁻

DP : *Double Positif CD4⁺CD8⁺*

DPEC : *Double Positive Effector Cell*

E :

EAE : *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*

EEC : *Early Effector Cell*

EM : *Effector Memory*

EMRA : *Effector Memory reexpressing CD45RA marker*

Eomes : Eomesodermine

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*

F :

FasL : Fas Ligand

Fezf2 : *Fez family zinc finger 2*

Foxp3 : *Forkhead box protein P3*

G :

GVHD : *Graft Versus Host Disease*

H :

HEV : Veinule à Endothélium Épais

HSP : *Heat Shoc Protein*

I :

ICOS : *Inducible T-cell COStimulator*

IEL : lymphocytes intra-épithéliaux

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

iNOS : *Inductible Nitric Oxid Synthase*

iNKT : NKT invariant

IP3 : Inositol TriPhosphate

iTreg : Lymphocyte T régulateur induit

K :

KLRG1 : *Killer cell Lectin Like Receptor subfamily G member 1*

L :

LAG-3 : *Lymphocyte Activation Gene 3*

LED ou LES : *Lupus Érythémateux Disséminé ou Systémique*

lpr : lymphoprolifération

LPS : Lipopolysaccharides

LRBA : *LPS-Responsive vesicle trafficking, Beach- and Anchor-containing*

M :

MAIT : *Mucosal-Associated Invariant T cell*

MDSC : *Myeloid Derived Suppressor Cell*

miR : microARN

MPC : *memory precursor cell*

MPEC : *Memory Precursor Effector Cell*

MFI : *Mean/Median Fluorescence Intensity*

mTEC : cellule Épithéliale de la Médulla Thymique

N :

NET : *Neutrophil Extracellular Trap*

NFAT : *Nuclear Factor of activated T cells*

NF- κ B : *Nuclear Factor kappa B*

NK : *Natural Killer*

NKT : *Natural Killer T lymphocyte*

nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel

P :

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

Panx1 : pannexine-1

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PD-1 : *Programmed cell Death 1*

PLAD : *Pre-Ligand Assembly Domain*

PLC : PhosphoLipase C

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

PS : PhosphatidylSérine

PSGL-1 : Ligand de la P-Sélectine 1

pTEC : progéniteur des Cellules Épithéliales Thymiques

Q :

QPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

R :

RAG : *Recombinant-Activating Gene*

RCPG : Récepteur Couplé au Protéines G

ROR γ : *Retinoid acide receptor-related Orphan Receptor gamma*

S :

SLEC : *Short Lived Effector Cell*

PLZF : *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*

SNC : Système Nerveux Central

SP : Simple Positif CD4⁺ ou CD8⁺

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

T :

TACE : *TNF- α Converting Enzyme*

TCR : *T-Cell Receptor*

TEC : Cellule Épithéliale Thymique

TGF : Transforming Growth Factor

Tconv : Lymphocyte T conventionnel

Th : Lymphocyte T *helper*

ThPOK : *Th Inducing POZ-Kruppel Factor*

TIM : *T cell/transmembrane Ig and Mucin*

TLR : *Toll Like Receptor*

TRAIL : *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

Treg : Lymphocyte T régulateur

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

Y :

Yaa : *Y-linked Autoimmune Accelerating*

EYFP : *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*

Résumé

Mon étude a porté sur le rôle du récepteur purinergique P2X7 (P2X7R) dans les processus physiopathologiques impliqués dans le développement des maladies auto-immunes de type lupique. Les souris MRL/*lpr*, déficientes en récepteurs d'apoptose Fas (mutation *lpr*), développent spontanément un lupus érythémateux systémique suite à l'accumulation de lymphocytes T pathogéniques CD4⁻CD8⁻ (DN) B220⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. Nous avons observé que ces lymphocytes ont un déficit d'expression en P2X7R à leur surface ce qui nous a amené à postuler que P2X7R pourrait jouer un rôle clef dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement du lupus. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons produit des souris C57BL/6J (B6) déficientes simultanément pour Fas (*lpr*) et P2X7R (P2X7KO). Les souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent une accumulation massive de lymphocytes T DN B220⁺, des titres très élevés en auto-anticorps et une forte dérégulation de l'expression des cytokines ce qui n'est pas le cas pour les souris B6 simples mutantes pour *lpr* ou P2X7KO confirmant pour la première fois l'implication de P2X7R dans l'homéostasie des lymphocytes T, en synergie avec le récepteur Fas. Les lymphocytes T DN pathogéniques, responsables de la lymphoaccumulation, sont issus majoritairement de la sous-population des lymphocytes T CD8⁺. L'inflammation chronique présente chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO induit l'activation de l'ensemble des populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ naïves conduisant à l'accumulation de lymphocytes T Effecteurs/Mémoires de type EM (effecteur mémoire) et CM (central mémoire) qui atteignent parfois le stade *exhausted* PD1⁺TIM3⁺. Les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et DN B220⁺ qui s'accumulent chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO ont une capacité de réactivation réduite. Ce biais fonctionnel et phénotypique a été montré en comparant la réponse immunitaire adaptative, contre un vecteur adénoviral codant pour l'ovalbumine, entre des souris déficientes en Fas et/ou P2X7R. Les réponses cellulaires et humorales sont moins importantes dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO que B6 et B6-P2X7KO. Dans les souris B6/*lpr*, on observe un niveau de réponses antigéniques intermédiaire. L'ensemble de ces résultats renforcent notre hypothèse sur le rôle synergique des récepteurs Fas et P2X7R dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement du lupus. Étant donné que le taux d'apoptose induit par l'activation de chacun des récepteurs Fas ou P2X7R est moins important dans les lymphocytes T CD8⁺ que CD4⁺, nous en concluons que la synergie entre les récepteurs Fas et P2X7 serait nécessaire pour l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺. Afin de préciser les mécanismes à l'origine de la maladie développée par les souris B6/*lpr*-P2X7KO et d'identifier l'impact de chaque récepteur sur l'expression des *loci* de susceptibilité au lupus, nous avons séquencé les ARNm exprimés dans la rate et les ganglions lymphatiques des souris MRL/*lpr* avant et après le développement de l'auto-immunité ainsi que chez les souris B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO et B6/*lpr*-P2X7KO et identifié trente gènes candidats.

Introduction

Les lymphocytes T et B jouent un rôle central dans la réponse immunitaire adaptative. Comme toutes les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes T sont issus de cellules souches de la moelle osseuse. Cependant, à la différence des autres cellules, elles subissent leur maturation dans le thymus, d'où leur nom²⁴. La maturation des lymphocytes T consiste en trois événements majeurs qui sont : 1) les réarrangements aléatoires des gènes codant pour les chaînes α et β du récepteur d'antigène (TCR, *T-Cell Receptor*) ce qui assure une immense diversité de reconnaissance antigénique (potentiellement de 10^{15} à 10^{20} TCR différents) ; 2) le mécanisme de sélection positive qui élimine les lymphocytes T dont le TCR n'est pas capable de reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'individu générant un répertoire de lymphocytes T capables de reconnaître les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH du soi ; 3) le mécanisme de sélection négative élimine du pool de lymphocytes T sélectionnés positivement ceux qui reconnaissent les molécules de CMH associées aux peptides du soi avec une trop forte avidité afin de réduire les risques d'auto-immunité. Les lymphocytes T, de phénotype $CD4^+$ ou $CD8^+$, qui ont survécu à ces trois mécanismes quittent alors le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires avec un phénotype mature naïf c'est-à-dire de lymphocytes n'ayant encore jamais rencontré d'antigènes en périphérie^{19,25,26}.

Les lymphocytes T matures naïfs sont activés au niveau des organes lymphoïdes secondaires, rate et ganglions lymphatiques (environ 800 chez l'Homme), par des cellules dendritiques (DC) ayant capturé l'antigène au site de l'infection. Les DC (myéloïde et plasmacytoïde) ont un phénotype immature dans les tissus où elles résident et acquièrent un état activé après capture de l'antigène et migration vers le ganglion lymphatique le plus proche où elles le présentent sous forme de peptides, par leurs molécules de CMH de classe I et/ou de classe II, aux lymphocytes T $CD8^+$ ou $CD4^+$ matures. L'activation des lymphocytes T matures naïfs par l'antigène ainsi que leur différenciation en cellules effectrices peuvent être suivies grâce à l'expression de molécules de surface comme le marqueur d'activation précoce CD69 ou « *very early activation marker* » ou à la diminution du taux d'expression membranaire de protéines comme la phosphatase CD45RB qui passe d'un niveau élevé ($CD45RB^{high}$) à un niveau faible ($CD45RB^{low}$) après activation par l'antigène.

Après activation, les lymphocytes T entrent dans une phase de multiplication intense, d'une durée de 4 à 5 jours, suite à la production autocrine d'IL-2 et à l'expression de la chaîne α (CD25) du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 (IL-2R α). À la fin de cette phase d'expansion clonale, les cellules se différencient en

lymphocytes T effecteurs exprimant à leur membrane un taux élevé en molécules d'adhérence CD44 (CD44^{high}) et faible en molécules L-sélectine (CD62L) responsables de la domiciliation (*homing*) aux organes lymphoïdes secondaires ce qui favorise leur capacité à migrer vers les sites inflammatoires. Afin de maintenir l'homéostasie des lymphocytes T, le pool de lymphocytes T effecteurs est réduit par une apoptose dépendante de la voie mitochondriale Bim en fin de réponse immunitaire primaire ou de la voie des récepteurs de mort Fas en fin de réponse immunitaire secondaire. Il est généralement considéré que les lymphocytes T mémoires sont issus des lymphocytes T effecteurs qui n'ont pas été éliminés par apoptose.

I. Développement et maturation des lymphocytes T

Les lymphocytes T doivent leur nom à l'organe responsable de leur maturation, le thymus. Son rôle consiste à générer des lymphocytes T compétents, c'est-à-dire capables à la fois de reconnaître des antigènes présentés par les molécules du CMH et d'être tolérants aux antigènes du soi. La maturation des thymocytes est le résultat d'interactions permanentes et réciproques entre les thymocytes et les cellules épithéliales du thymus (TEC, Figure 1). Les cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC) ainsi que leurs progéniteurs (pTEC) assurent le recrutement dans le thymus des progéniteurs des cellules lymphoïdes (CLP) de la moelle osseuse (Figure 1). Les cTEC sont également responsables de leur différenciation en thymocytes CD4⁻CD8⁻ (DN). La maturation des thymocytes DN en lymphocytes T débute par les réarrangements aléatoires des segments géniques codant les chaînes β (Vβ, Dβ, Jβ) puis α (Vα, Jα). Le panel d'environ 10¹³ TCR différents qui est produit par individu à ce stade de maturation comprend les récepteurs capables ou non d'interagir avec les molécules du CMH ainsi que les récepteurs présentant ou non une auto-réactivité. À l'issue du réarrangement de la chaîne du β du TCR stimulé par les cTEC, les thymocytes acquièrent le phénotype double positif CD4⁺CD8⁺ ^{19,25,26} (DP, Figure 1, Figure 3). Afin de produire des lymphocytes T utiles et non auto-immuns, les lymphocytes T subissent successivement deux mécanismes de sélection appelés sélection positive et négative ²⁷⁻²⁹ (Figure 1).

.I.1 Recrutement et maturation des progéniteurs lymphoïdes dans le thymus

Les CLP de phénotype DN sont recrutées dans le cortex thymique à partir de la moelle osseuse grâce aux récepteurs de chimiokines CCR7, CCR9 et CXCR4 et à leurs chimiokines respectives CCL21, CCL25 et CXCL12 produites par les cellules épithéliales thymiques cTEC et pTEC ^{19,25,30-32} (Figure 1, signal a). Les taux d'expression en molécules CD44 et CD25 permettent de classer les thymocytes DN en quatre stades

de différenciation (DN1 à DN4) de phénotype, respectivement, $CD44^+CD25^-$, $CD44^+CD25^+$, $CD44^-CD25^+$, $CD44^-CD25^-$ ³³ (Figure 3). Les DN1 (CLP arrivées dans le cortex thymique) prolifèrent suite à leur activation par l'Interleukine-7 (IL-7) et Delta-Like Ligand 4 (DLL4), le ligand du récepteur Notch1, qui sont fortement exprimés par les cTEC^{34,35}. Ces signaux d'activation sont responsables de l'expression des protéines recombinases (RAG, *Recombinant-Activating Gene*) 1 et 2 et donc du réarrangement des segments géniques V, D, J du *locus* β du TCR ainsi que de l'expression membranaire du CD25 aux stades DN2 et DN3. La chaîne β réarrangée s'associe avec la pseudo chaîne α (pT α) pour former des complexes pré-TCR (pT α :TCR β). L'adressage à la membrane plasmique des complexes pré-TCR induit les réarrangements des segments géniques V et J du *locus* α (TCR α) par les protéines recombinases RAG ainsi que l'expression des récepteurs CD4 et CD8 à la membrane plasmique. Les cellules présentent alors le phénotype TCR $\alpha\beta^{\text{low}}CD4^+CD8^+$ (DP)^{36,37}(Figure 1, signal c).

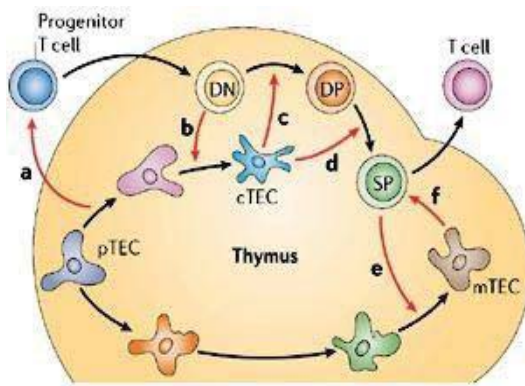


Figure 1: Résumé des principales étapes de maturation des lymphocytes T dans le thymus

Les progéniteurs des cellules épithéliales thymiques (pTEC) assurent le recrutement des cellules lymphoïdes progénitrices (CPL) (signal a). Les thymocytes DN induisent la différenciation des pTEC (signal b) en cellules épithéliales corticales (cTEC). Ces dernières créent l'environnement (signal c) responsable de la maturation des thymocytes DN en lymphocytes DP TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$. Les cTEC sont également responsables de la différenciation des lymphocytes DP en lymphocytes SP ($CD4^+$ ou $CD8^+$) (signal d ou sélection positive). Les lymphocytes SP sont eux-mêmes requis (signal e) pour la différenciation des pTEC en cellules épithéliales médullaires (mTEC). Les mTEC induisent alors la sélection négative (signal f) des lymphocytes T SP. Les lymphocytes T matures survivants rejoignent alors la périphérie.¹⁹

.1.2 Sélections thymiques

.1.2.a Sélection positive

Les thymocytes TCR $\alpha\beta^{\text{low}}CD4^+CD8^+$ (DP) possèdent des récepteurs (environ 10^{13} TCR différents/individu) capables ou non d'interagir avec les molécules de classe I ou II du CMH. La sélection positive est le mécanisme qui permet d'éliminer les cellules incapables de réaliser cette interaction au niveau des cellules épithéliales du cortex thymique, cTEC, dont la particularité est d'exprimer les molécules de classe I et II du CMH (CMHI et CMHII) (Figure 2). Ces lymphocytes DP meurent par une apoptose dépendante de la molécule Bim, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (sous-famille *BH3-only*). Bim induit l'apoptose en séquestrant dans le cytosol la protéine anti-apoptotique Bcl-2 permettant ainsi à

Bak et Bax de former un pore mitochondrial pour la libération du cytochrome c³⁸. À l'inverse, survivront les lymphocytes T DP capables d'une interaction, même de faible affinité, entre leurs TCR et les complexes formés entre un peptide du soi et une molécule de classe I ou de classe II du CMH (peptide-CMH) (Figure 1, signal d et Figure 2). Environ 1 à 5 % des lymphocytes T DP survivent et se différencient en lymphocytes T SP CD4⁺ ou CD8⁺ (Figure 2). L'interaction du TCR avec le complexe peptide-CMH induit l'activation, dans le lymphocyte T, de la phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) responsable de la production de diacylglycerol (DAG) et d'Inositol triphosphate (IP3). Ces deux messagers induisent, respectivement, l'activation de la voie RAS/MAPK (Erk) et l'augmentation du taux de calcium (Ca²⁺) cytosolique, lui-même, responsable de l'activation du facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of activated T cells*). NFAT et Erk activés sont responsables de la survie du lymphocyte T^{10,33}. À la fin de la sélection positive, les lymphocytes T acquièrent le phénotype TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$ CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺^{10,29,33,36}. Les lymphocytes T SP migrent alors vers la médulla du thymus pour y subir le mécanisme de la sélection négative.

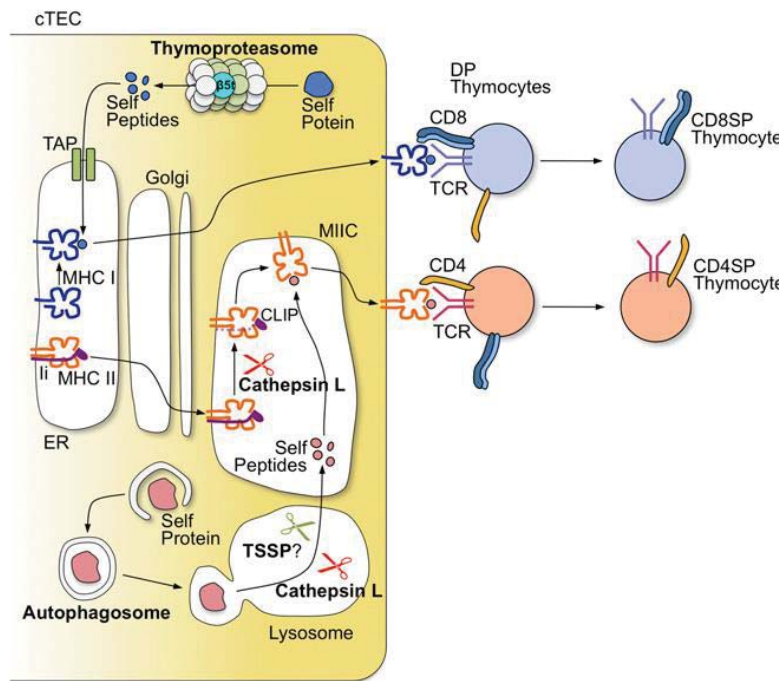


Figure 2 : Apprêtement des antigènes du soi dans les cTEC lors de la sélection positive

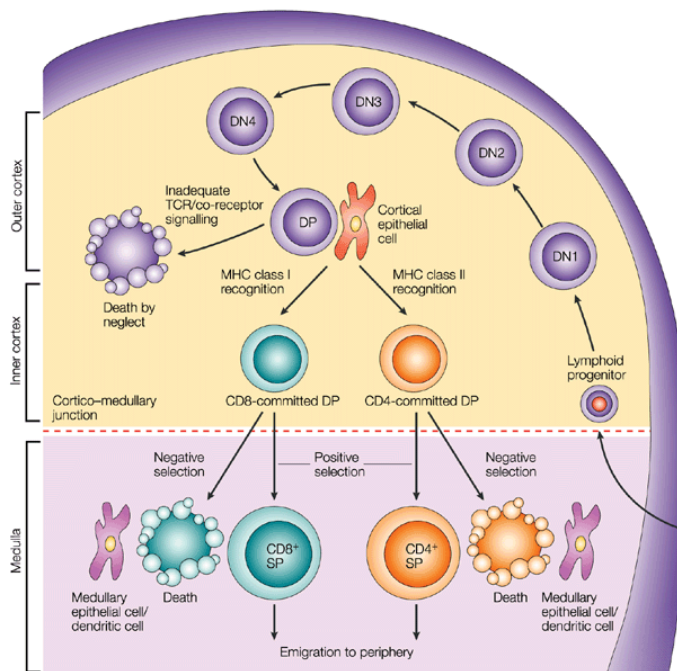
Les peptides du soi issus des protéines cytoplasmiques sont dégradés dans le thymo-protéasome contenant la sous-unité spécifique $\beta 5T$ puis sont transportés dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP. Les peptides sont chargés sur les molécules du MHC I avant d'être adressés à la membrane plasmique. Les peptides issus de la dégradation des protéines du soi par les lysosomes lors de processus tel que l'autophagie sont chargés sur des molécules de CMH II. L'autophagie est constitutivement active dans les cTEC. La cathepsine L est impliquée dans la dégradation endosomale de la chaîne invariante Ii associée aux molécules du MHC II ainsi que dans la production des peptides du soi qui leur sont associés. Le peptide CLIP est éliminé par la molécule de CMH invariant HLA-DM permettant le chargement de la molécule du CMH II en peptides.¹⁰

.1.2.b Sélection négative

Le mécanisme de sélection négative ou tolérance centrale vise à éliminer les lymphocytes T auto-réactifs et potentiellement auto-immuns (Figure 1 et Figure 3). L'interaction TCR/peptide-CMH, avec

une forte avidité (Figure 4), induit l'apoptose des lymphocytes T SP par l'augmentation du taux d'expression de la molécule Bim et son activation par phosphorylation³⁹. Il a lieu au niveau de la médulla thymique grâce aux cellules épithéliales (mTEC) et aux cellules dendritiques (DC) (Figure 1, signal f ; Figure 3). Les DC, en revanche, ne semblent pas impliquées dans le mécanisme de sélection positive⁴⁰. Les DC thymiques sont dérivées soit de précurseurs d'origine thymique⁴¹ soit de DC périphériques qui rejoignent le thymus de façon continue par la circulation sanguine⁴². Les TEC expriment le facteur de transcription appelé AIRE (*auto-immune regulator*) qui leur est propre et dont le rôle est essentiel pour la sélection négative à travers l'expression ectopique des protéines d'organes endocriniens (ovaires, testicules, glandes salivaires, glandes lacrymales, pancréas, glandes surrénales, thyroïdes et parathyroïde) et non endocrinien (foie et estomac) et leur présentation peptidique par les molécules du CMH⁴³. Les mTEC expriment également des molécules de costimulation dont B7 et CD40^{43,44} et sécrètent les chimiokines CCR19 et CCR21 (ligands du CCR7) afin de recruter vers la médulla les lymphocytes SP sélectionnés positivement dans le cortex. Dans les souris déficientes pour CCR7 ou ses ligands, les thymocytes SP échappent à la sélection négative en rejoignant directement la périphérie grâce au signal chimiotactique sphingosine-1-phosphate (S1P). Ces souris développent des syndromes inflammatoires et auto-immuns des glandes lacrymales et salivaires (dacryoadénite et sialadénite chroniques)⁴⁵. Seuls les lymphocytes T SP n'ayant pas ou peu interagi avec les mTEC se différencient en lymphocytes T matures CD4⁺ ou CD8⁺ exprimant les récepteurs pour la S1P (S1P1) ce qui leur permet de quitter le thymus et de rejoindre les organes lymphoïdes périphériques.

Figure 3 : Maturation des thymocytes



Les progéniteurs lymphoïdes (CLP) migrent de la moelle osseuse au cortex thymique où ils acquièrent le phénotype DN1 (CD44⁺CD25⁻). Ils se différencient ensuite du stade DN2 à DN4 (CD44⁺CD25⁺, CD44⁻CD25⁺ et CD44⁻CD25⁻) et prolifèrent grâce à l'environnement cortical. Au stade DN4, les thymocytes expriment le pré-TCR ce qui déclenche le réarrangement de la chaîne α du TCR et l'expression des corécepteurs CD4 et CD8 aboutissant au stade DP des lymphocytes T. L'interaction des lymphocytes DP avec les cTEC induit leur différenciation en lymphocytes SP CD4⁺ ou CD8⁺ selon le complexe reconnu, peptide-CMHII ou peptide-CMHI. Les lymphocytes T DP n'ayant pas réussi à interagir avec les cTEC meurent par apoptose. Les lymphocytes T SP subissent, ensuite, la sélection négative dans la médulla. L'interaction des lymphocytes T SP fortement auto-réactifs avec les mTEC induit leur apoptose. Les lymphocytes SP peu ou pas auto-réactifs se différencient en lymphocytes T matures avant de rejoindre la périphérie.²¹

.1.2.c Autres sous-populations lymphocytaires T produites dans le thymus

En plus des lymphocytes T conventionnels (Tconv) CD4⁺ ou CD8⁺ (αβ), le thymus est responsable du développement d'autres sous-populations lymphocytaires T comme les lymphocytes T régulateurs (Treg), les *Natural Killers T* (NKT), les lymphocytes intraépithéliaux CD8αα et les *Mucosal-Associated Invariant T cells* (MAIT).

.1.2.c.1 Développement des lymphocytes T régulateurs

La sélection négative a été longtemps considérée comme le mécanisme majeur d'induction de tolérance au soi. En plus de ce rôle, le thymus est responsable du développement et de la maturation de populations suppressives et régulatrices de la réponse immunitaire notamment les lymphocytes T régulateurs (Treg). Lors de la sélection négative (paragraphe .1.2.b, page 17), une partie des lymphocytes T SP CD4⁺ ayant eu une interaction TCR/peptide-CMH de forte avidité avec les mTEC se différencient en lymphocytes Treg au lieu de mourir par apoptose¹⁶ (Figure 4 et Figure 5). Le récepteur de costimulation

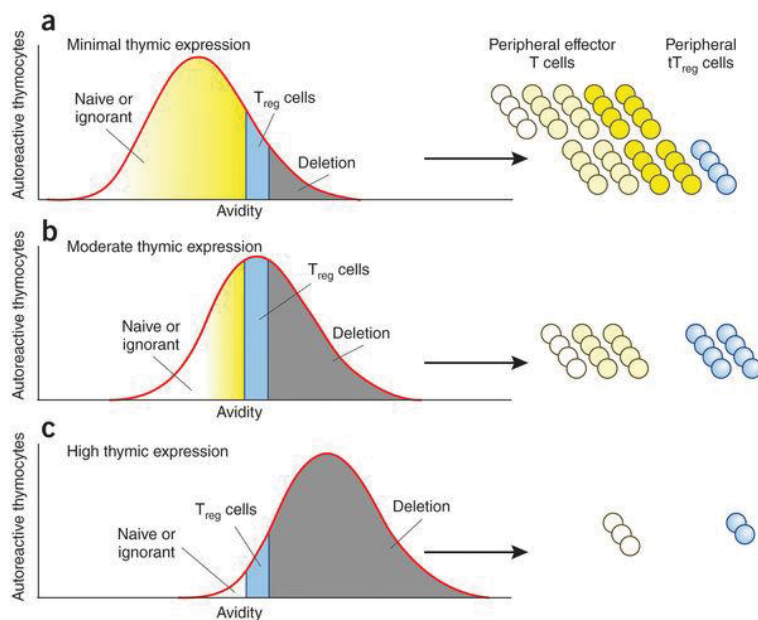


Figure 4 : La survie des thymocytes dépend de l'avidité du TCR pour les complexes peptide-CMH lors de la sélection négative.

Dans la médulla thymique, les lymphocytes T SP entrent en apoptose si l'avidité de leurs TCR pour les complexes peptide-CMH exprimés par les mTEC ou les DC est globalement élevée. Le taux d'avidité reflète le taux d'expression de la protéine du soi dans le thymus.²⁰

CD28 et ses ligands CD80/CD86 (B7-1/B7-2) sont nécessaires pour cette différenciation⁴⁶⁻⁴⁸. L'ensemble de ces *stimuli* (TCR/CMH et CD28/B7) induit l'activation des facteurs de transcription NFAT et c-Rel responsables de l'expression du facteur de transcription Foxp3 dans les lymphocytes T SP CD4⁺ et leur différenciation en lymphocytes Treg (Figure 4 et Figure 5). L'inactivation de ces facteurs induit une forte déficience en lymphocytes Treg thymiques (Treg naturel ou nTreg) mais également en lymphocytes Treg induit en périphérie (iTreg) à partir des lymphocytes T conventionnels⁴⁹⁻⁵¹. D'autres récepteurs de

costimulation semblent être impliqués dans la différenciation des nTreg dans le thymus notamment le CD40 et son ligand CD154 (CD40L)⁵². La régulation cytokinique est également un élément important dans la différenciation des lymphocytes Treg thymiques et périphériques. Du fait que les lymphocytes Treg expriment des taux élevés de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), il a été initialement suggéré que la signalisation par l'IL-2 jouerait un rôle important dans le développement thymique des lymphocytes nTreg mais cette voie n'est pas exclusive car les souris déficientes pour l'IL-2 ou son récepteur CD25 ont une réduction du nombre de lymphocytes nTreg de 50 % seulement⁵³. La déficience en l'IL-2 dans le thymus peut être compensée par d'autres cytokines pouvant interagir avec la chaîne γ du récepteur à IL-2 (IL-2R γ , CD132) comme l'IL-7 et l'IL-15^{54,55}. De même, en plus de son rôle dans la différenciation en périphérie des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels en lymphocytes iTreg, le TGF- β semble être crucial dans la différenciation des nTreg dans le thymus. Il peut donc également compenser la déficience en IL-2. À l'inverse, les souris déficientes à la fois pour le TGF- β et l'IL-2 sont complètement dépourvues de lymphocytes nTreg. L'association des deux cytokines est donc nécessaire pour la différenciation des lymphocytes nTreg dans le thymus, en particulier, en induisant l'expression de Foxp3^{56,57} (Figure 5).

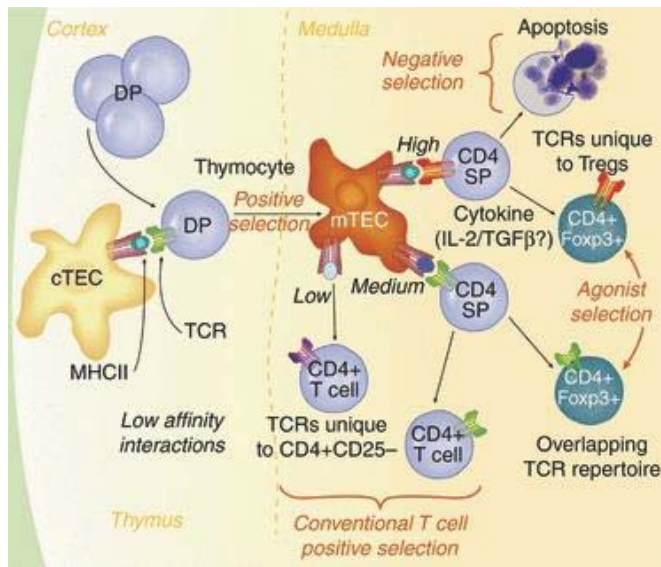


Figure 5 : Maturation des lymphocytes T régulateurs dans le thymus

Les TCR des lymphocytes T SP CD4⁺ ayant une forte avidité pour les complexes peptide-MHCII sont éliminés par apoptose dans la médulla. Les lymphocytes T auto-réactifs peuvent cependant échapper à cette mort cellulaire suite à une stimulation par l'IL-2 ou le TGF- β et se différencier en lymphocytes T régulateurs.¹⁶

.1.2.c.2 Développement des lymphocytes NKT

Les lymphocytes NKT se développent également dans le thymus. Ils constituent un groupe hétérogène qui partage certaines propriétés phénotypiques et fonctionnelles avec les cellules NK et les lymphocytes T conventionnels d'où leur nom. Le mécanisme de développement des NKT le plus connu est celui des iNKT (NKT invariant ou de type 1) responsables de la reconnaissance d'antigènes lipidiques et glycolipidiques présentés par la molécule non polymorphe CD1d². Les cellules iNKT se caractérisent

également par l'expression du facteur de transcription PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*) responsable de leurs propriétés effectrices. À l'inverse des lymphocytes T dont les TCR $\alpha\beta$ présentent une grande diversité, les iNKT possèdent une chaîne α du TCR invariante (V α 14-J α 18 chez la souris, V α 24-J α 18 chez l'Homme) couplé à des chaînes β de diversité limitée (V β 8.2, V β 7, V β 2 chez la souris, V β 11 chez l'homme). Comme pour les lymphocytes T, leur sélection positive a lieu dans le cortex thymique mais dépend de leur capacité à reconnaître les complexes CD1d-glycolipide présents à la surface des lymphocytes T DP et non des cTEC⁵⁸ (Figure 6). Les précurseurs des iNKT migrent ensuite vers la médulla grâce à la stimulation de leur récepteur CCR7 par la chimiokine CCL21 secrétée par les mTEC⁵⁹. Tout comme les lymphocytes T, les cellules iNKT sont soumises au mécanisme de la sélection négative. La maturation des iNKT dans la médulla dépend de leur interaction avec les mTEC et implique des molécules de costimulation de la famille B7 ainsi que la cytokine IL-15⁶⁰. Le facteur de transcription AIRE ne semble pas impliqué dans la maturation des iNKT bien que son expression par les mTEC dépende d'une interaction entre les molécules RANKL et RANK exprimées, respectivement, par les précurseurs des iNKT et des mTEC^{2,61} (Figure 1, signal e; Figure 6). Chez l'Homme et la souris, les iNKT quittent le thymus avec un phénotype majoritairement de type CD4⁺ ou DN pour rejoindre le foie ou la rate et plus rarement les ganglions lymphatiques.

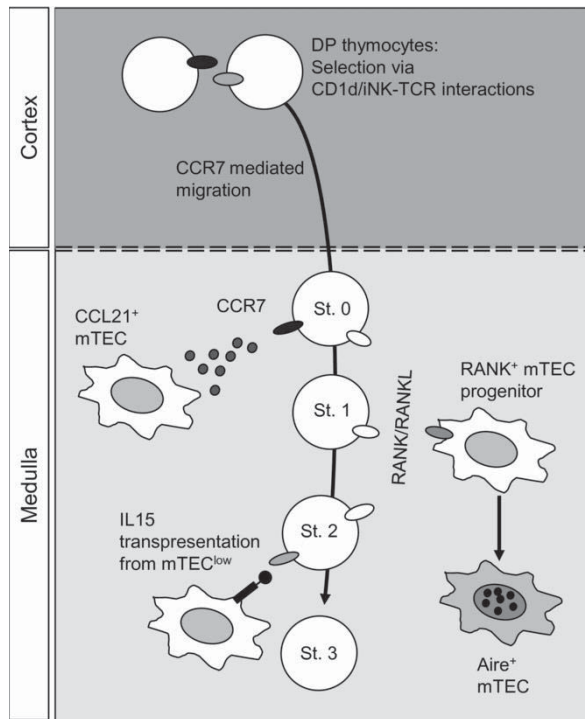


Figure 6: Maturation des lymphocytes iNKT dans le thymus

Les thymocytes DN TCR/CD3⁺ précurseurs des lymphocytes iNKT subissent une sélection positive dans le cortex thymique au contact des complexes CD1-glycolipides des lymphocytes T DP. Les thymocytes capables de cette interaction survivent et migrent vers la médulla grâce au signal chimioattractant CCL21/CCR7. Ces thymocytes ont un phénotype CD24⁺CD44⁻NK1.1⁻ appelé stade 0 (St. 0). Grâce à l'environnement médullaire, ils se différencient en thymocytes de stade 1 (St. 1) de phénotype CD24⁺CD44⁺NK1.1⁻. À ce stade et avant leur différenciation en thymocytes de stade 2 (St. 2 : CD24⁻CD44⁺NK1.1⁻), ils induisent la différenciation des progéniteurs des mTEC en mTEC matures Aire⁺ par l'interaction RANK/RANKL. L'interaction des thymocytes St. 2 avec les mTEC associée à une costimulation par B7 et l'IL-15 leur permet d'exprimer le récepteur NK1.1 et d'atteindre le stade 3 (St. 3 : CD24⁻CD44⁺NK1.1⁺). Ils quittent alors le thymus en tant que lymphocytes iNKT matures.²

.1.2.c.3 Développement des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été découverts en 1984. Ils sont appelés ainsi car leurs TCR sont constitués des chaînes γ et δ au lieu des chaînes conventionnelles α et β . Les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent à plus de 70 % le phénotype DN. Ils peuvent cependant exprimer les phénotypes $CD4^-CD8^+$ (30 %) et $CD4^+CD8^-$ (< 1 %). Leurs fonctions sont diverses et ils participent aux réponses immunitaires anti-infectieuses, antitumorales, à la régulation des réponses immunitaires ou encore à la réparation tissulaire⁶². Ils représentent environ 5 % des lymphocytes T chez l'Homme et la souris et sont très présents dans les épithéliums et les muqueuses. Ils sécrètent préférentiellement les cytokines IFN- γ et IL-17 grâce à l'expression des facteurs de transcription T-bet et ROR γ t⁶³. Ils se développent dans le cortex thymique à partir des thymocytes au stade DN3 (Figure 3) grâce à la lymphotoxine β sécrétée par les lymphocytes T DP⁶⁴. Le stade DN3 est celui auquel un thymocyte s'engage dans le lignage $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ en fonction de différents facteurs. Les thymocytes DN3 induisent les réarrangements des segments géniques V(D)J des chaînes β , γ et δ du TCR en réponse à un signal Notch/Delta-Like Ligand 1 (DLL1). Les DN3 ayant échoué à adresser correctement les pré-TCR (pT α : TCR β) à la membrane, et à recevoir le signal Notch/DLL1 se différencient en thymocytes précurseurs des lymphocytes T $\gamma\delta$. De même, en cas de déficience en Notch/DLL1, les thymocytes DN3 se différencient exclusivement en lymphocytes T de TCR $\gamma\delta$ et pas $\alpha\beta$ ⁶⁵. À ce jour, il n'est pas connu de mécanisme de sélection négative pour les lymphocytes T $\gamma\delta$.

.1.2.c.4 Développement des lymphocytes T intraépithéliaux $CD8\alpha\alpha$

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) constituent une sous-population hétérogène de lymphocytes T retrouvée dans l'épithélium intestinal où ils jouent un rôle de première ligne de défense contre les infections tout en préservant l'intégrité de la muqueuse intestinale. Le thymus produit deux sous-populations d'IEL dites naturelles (nIEL) qui expriment un TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. La sous-population exprimant le TCR $\alpha\beta$ se développe par un mécanisme de sélection positive à partir d'un précurseur thymique triple positif $CD4^+CD8\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$. Leur sélection et maturation est induite par une forte reconnaissance des antigènes du soi. Ils acquièrent alors un phénotype de type mémoire $CD4^-CD8\alpha\beta^-CD8\alpha\alpha^+$ et migrent vers l'épithélium intestinal après l'expression de l'intégrine $\alpha4\beta7$ et du récepteur de *homing* pour l'intestin CCR9⁶⁶⁻⁶⁸.

.I.2.c.5 *Mucosal-Associated Invariant T cells*

Les *Mucosal-Associated Invariant T cells* (MAIT) expriment un TCR $\alpha\beta$ mais pas les corécepteurs CD4 et CD8 et représentent 1 à 10% des lymphocytes T sanguins, 10% des IEL et environ 45% des lymphocytes T intrahépatiques. Leurs TCR $\alpha\beta$, dont la chaîne α possède une diversité limitée (V α 7.2-J α 33 chez l'homme), reconnaissent des métabolites microbiens, dont les dérivés de riboflavine (vitamine B2) des champignons et bactéries, présentés par des molécules non polymorphes du CMH1b (MR1). Les MAIT ne reconnaissent pas les agents infectieux ne produisant pas de riboflavine. Comme pour les iNKT, ils sont sélectionnés positivement par les lymphocytes DP du cortex thymique selon qu'ils reconnaissent ou non des molécules MR1. Deux sous-populations de MAIT ont été décrites, une exprimant le facteur de transcription T-bet et l'autre ROR γ t et sécrétant, respectivement, de l'IFN- γ ou de l'IL-17⁶⁹.

.II Lymphocytes T $\alpha\beta$ du stade naïf au stade mémoire

.II.1 Circulation et *homing* des lymphocytes T

À leur sortie du thymus, les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, rate et ganglions lymphatiques qui contiennent des zones distinctes riches en lymphocytes T (zone T) et en lymphocytes B (zone B)⁷⁰. Un lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺ mature dit « naïf » (n'ayant jamais rencontré d'antigènes) présente le phénotype CD62L⁺CD45RA/RB^{high}CD44^{low} (CD45RB chez la souris, CD45RA chez l'Homme) et se trouve en phase G0 du cycle cellulaire (état quiescent). Cependant, il possède une activité circulatoire importante et aléatoire d'un organe lymphoïde secondaire à l'autre par la circulation sanguine et lymphatique. Les lymphocytes T naïfs entrent dans l'organe lymphoïde par la circulation sanguine et en ressortent, à l'exception notable de la rate, par la circulation lymphatique avant un retour vers la circulation sanguine. Ils répètent ce processus, pendant toute leur vie qui peut durer plusieurs mois, à la recherche d'antigènes étrangers dont ils sont spécifiques^{71,72}. Leur survie est assurée grâce à la cytokine IL-7 présente dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires et dont la déficience induit une réduction drastique du nombre des lymphocytes T naïfs^{73,74}. L'activation des lymphocytes T naïfs, qui n'a lieu que dans les organes lymphoïdes secondaires, permet leur survie et induit leur prolifération et migration aux sites infectieux afin de participer à la réponse immunitaire. Pour accéder aux organes lymphoïdes secondaires, en particulier les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer de l'intestin grêle, les lymphocytes T matures naïfs doivent traverser les parois des veinules à endothélium épais (HEV) dont la fonction est de recruter les lymphocytes T naïfs (et mémoire central, T CM), à partir de la circulation sanguine (Figure 7). Contrairement aux autres organes lymphoïdes secondaires, la rate n'est pas reliée au réseau lymphatique. De plus, elle est dépourvue de HEV bien que les lymphocytes T circulant puissent

accéder à la zone T qui entoure les artérioles de la pulpe blanche. À l'inverse, des HEV peuvent se développer dans les organes non lymphoïdes lors d'inflammation chronique. Les HEV expriment les molécules d'adhérence CD34, GlyCAM, ICAM-1 et sécrètent la chimiokine CCL21, alors que, les lymphocytes T expriment leurs ligands LFA-1 et CD62L ainsi que le récepteur de chimiokine CCR7. Le franchissement des HEV par les lymphocytes T naïfs nécessite plusieurs étapes. La liaison des molécules CD62L des lymphocytes T avec les molécules d'adhérence cellulaire, GlyCAM et CD34, exprimées par les HEV permettent aux récepteurs CCR7 des lymphocytes T d'interagir avec son ligand CCL21 sécrété par les HEV. La signalisation induite par CCL21/CCR7 entraîne une activation de LFA-1 et sa liaison avec son ligand ICAM-1 ce qui permet aux lymphocytes T de s'accrocher fermement aux épithéliums du HEV avant de rentrer par diapédèse (extravasation) dans le ganglion lymphatique ⁷⁰ (Figure 7). Le facteur de transcription Foxo1 est impliqué dans l'ensemble de ces phénomènes, survie et *homing*, en régulant l'expression de CD62L, CCR7 et CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7) dans les lymphocytes T naïfs ⁷⁵. Un lymphocyte T mature naïf séjourne dans un ganglion lymphatique durant quelques heures avant de rejoindre un autre ganglion en absence d'activation par son antigène spécifique. Le mécanisme de sortie est, comme dans le thymus, dépendant du récepteur S1P1 et de son ligand, S1P, qui est présent à un taux élevé dans le sang et la lymphe ^{70,76}.

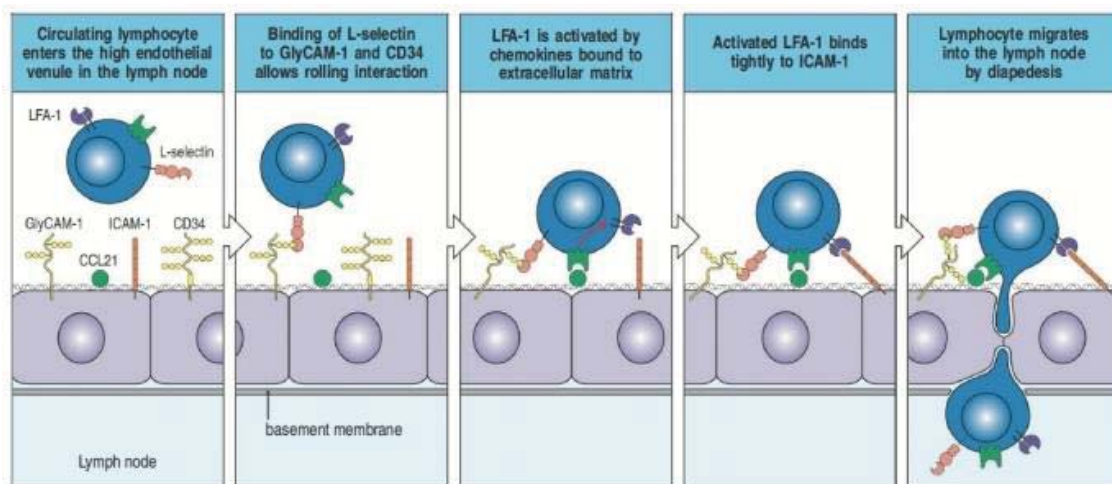


Figure 7 : Homing des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires

La molécule L-sélectine (CD62L), exprimée à la surface des lymphocytes T au stade naïf et mémoire central, est nécessaire pour les premières étapes de homing. L'interaction de CD62L avec ses ligands, CD34 et GlyCAM-1, à la paroi des veinules à endothélium épais (HEV) des organes lymphoïdes secondaires déclenche l'étape de « rolling » nécessaire pour l'entrée (homing) du lymphocyte T dans l'organe lymphoïde secondaire. Le taux d'expression de CD62L à la surface d'un lymphocyte T dépend de son stade d'activation/maturation. ⁸

.II.2 Réponse immunitaire des lymphocytes T

Chez la souris comme chez l'Homme, il existe entre 20 et 1000 lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ naïfs spécifiques d'un antigène. La réponse immunitaire des lymphocytes T à un antigène se résume à cinq grandes phases : 1) Activation, 2) Expansion clonale, 3) Différenciation, 4) Contraction clonale et 5) Mémoire. La cellule dendritique est le principal type cellulaire responsable des phases d'activation et de différenciation des lymphocytes T ⁷⁷⁻⁷⁹.

.II.2.a Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées dans la capture, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Elles sont également dotées de capacités migratoires. Au stade immature, les DC expriment des taux faibles de complexes peptide-CMH et présentent des antigènes du soi. Après capture d'un antigène par phagocytose ou pinocytose, les DC possèdent une très grande capacité de présentation antigénique, comparé aux autres cellules présentatrices d'antigènes (CPA), grâce à la production d'un nombre plus important de complexes peptides-CMH notamment de classe II, et de très grandes capacités de costimulation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ par leurs molécules CD40, CD80 et CD86 (Figure 8) ce qui en fait la sous-population cellulaire majeure pour la présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T voire exclusive si les lymphocytes T sont naïfs. De plus, la même DC peut activer, simultanément, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du même antigène grâce au mécanisme de présentation croisée des antigènes (ou *cross presentation*) par les molécules de classe I du CMH ⁸⁰.

Les antigènes peuvent atteindre les organes lymphoïdes secondaires par deux voies. L'antigène libre peut atteindre la rate par la circulation sanguine et les ganglions lymphatiques par la lymphe. Des complexes peptides-CMH peuvent être alors exprimés par les DC résidents dans les organes lymphoïdes secondaires qui activeront, en quelques heures, les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène. Une voie plus lente d'activation des lymphocytes T, pouvant nécessiter plusieurs jours, est celle de la migration des DC exprimant CCR7 du foyer inflammatoire aux ganglions lymphatiques suite à la reconnaissance des motifs antigéniques associés aux pathogènes PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) par leurs PRR (*Pattern Recognition Receptor*) membranaires et cytoplasmiques (*Toll-like receptor, C-type lectin receptor, C-type lectin receptor, Mannose receptor, asialoglycoprotein receptor family, NOD-like receptor, RIG-I-like receptor*) ^{70,81,82}. Comme pour les lymphocytes T, la migration des DC vers les zones T des ganglions

lymphatiques les plus proches dépend de l'expression du récepteur CCR7 par les DC et de la sécrétion des chimiokines CCL19 et CCL21 par les cellules stromales du ganglion^{82,83}.

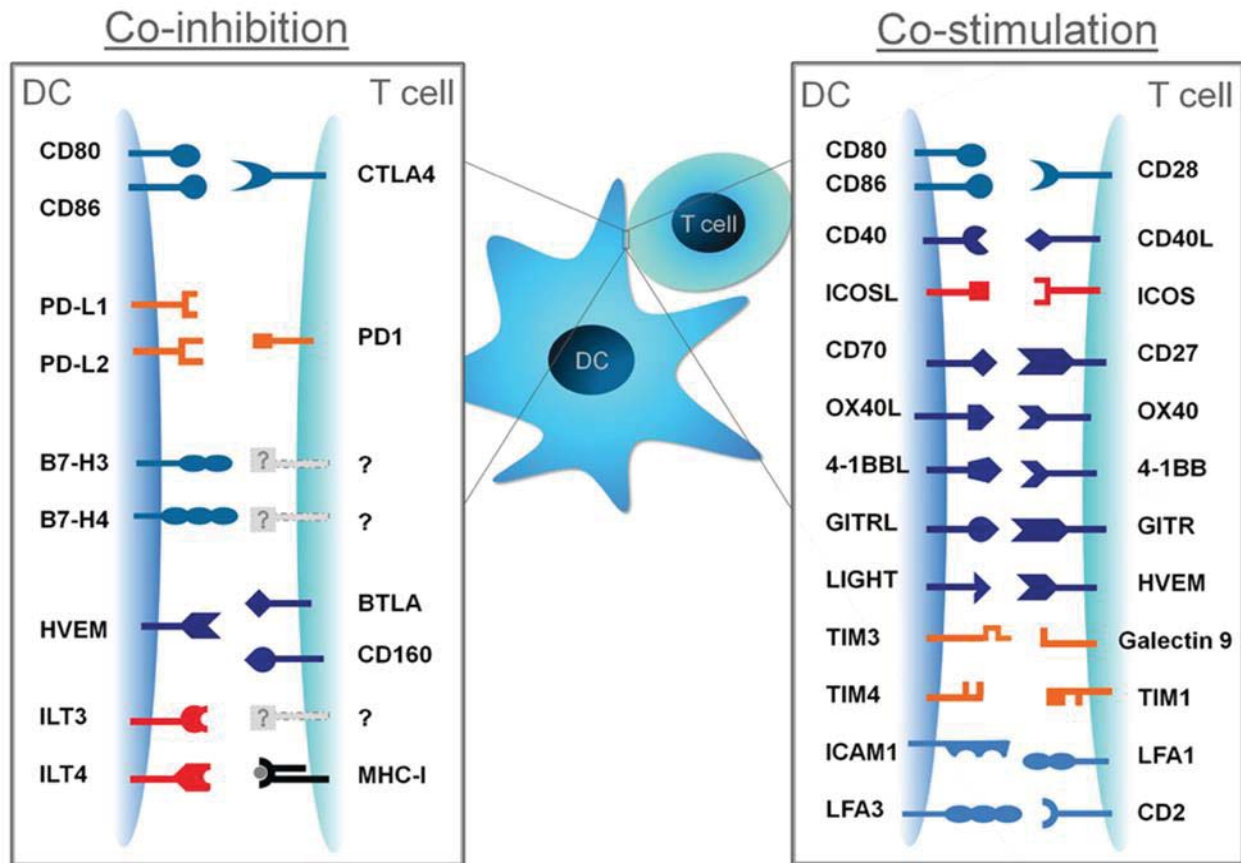


Figure 8 : Molécules et ligands de costimulation et coinhibition exprimés par les DC et les lymphocytes T

Selon la nature du deuxième signal transmis par les DC aux lymphocytes T, leur niveau d'activation est amplifié ou inhibé. Les molécules de costimulation stimulent les fonctions effectrices des lymphocytes T alors que les molécules de co-inhibition les régulent négativement. Les molécules de costimulation et de co-inhibition appartiennent à trois superfamilles : 1) TNF/TNFR ; 2) immunoglobulines et 3) TIM. Les molécules de costimulation et de co-inhibition ainsi que leurs ligands sont exprimées par les APC et les lymphocytes T mais également par des cellules non lymphoïdes ou des cellules cancéreuses.^{4,5}

L'activation d'un lymphocyte T naïf requière un contact physique avec une DC à travers les interactions TCR/peptide-CMH et CD28/B7 (CD80/CD86, Figure 8). La forte mobilité des lymphocytes T à l'intérieur du ganglion lymphatique augmente les chances d'interaction des lymphocytes T spécifiques avec les antigènes présentés par les DC. La liaison TCR/peptide-CMH induit une réorganisation locale des protéines du cytosquelette pour former la synapse immunologique. Le complexe TCR/peptide-CMH, les corécepteurs CD4 ou CD8 et les protéines de costimulation CD28/B7 occupent la partie centrale de la synapse. La partie périphérique de la synapse est occupée par les molécules d'adhérence CD44 et LFA-1/ICAM-1, la sialomucine CD43 ainsi que la phosphatase CD45^{84,85} (Figure 8). L'ensemble de ses

interactions au niveau de la synapse immunologique induit en moins de deux heures l'expression du marqueur d'activation précoce, CD69, à la surface des lymphocytes T qui forme lors un complexe avec le récepteur S1P1 induisant son inhibition, son internalisation et sa dégradation par le protéasome ce qui assure la rétention des lymphocytes T récemment activés dans l'organe lymphoïde secondaire pendant toute la durée de l'expansion clonale. Les cytokines, dont les IFN- α et β , peuvent également induire l'expression de CD69 et bloquer la sortie des lymphocytes T du ganglion ⁸⁶. L'état d'activation des DC peut être maintenu dans le ganglion lymphatique grâce à la présence de macrophages résidents sécrétant les cytokines proinflammatoires TNF- α et IL-1 et de lymphocytes T CD4⁺ récemment activés exprimant la molécule de costimulation CD40L. Ses signaux d'activation permettent aux DC de maintenir un taux élevé d'expression des complexes peptide-CMH et des différentes molécules de costimulation CD40 et CD80/CD86 ⁸⁰.

.II.2.b Expansion clonale des lymphocytes T

Le nombre de lymphocytes T naïfs spécifiques d'un même antigène est très réduit du fait de la très grande diversité du répertoire généré lors de la maturation thymique (paragraphe .I.2, page 16). Pour être efficace, une réponse immunitaire requière donc une augmentation considérable du nombre de lymphocytes T spécifiques. Suite à leur activation par les DC, les lymphocytes T naïfs entrent dans une phase de division cellulaire intense appelée « expansion clonale ». Celle-ci comporte de 10 à 20 cycles de divisions cellulaires dont chacun dure entre 4 et 6 heures multipliant par au moins $5 \cdot 10^4$ le nombre de lymphocytes T spécifiques de l'antigène ^{87,88}. L'intensité de l'expansion clonale varie, en fait, avec la sous-population de lymphocytes T activés. Ainsi, il a été estimé que le nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques peut être augmenté d'un facteur 100 000 au pic de l'infection alors qu'il n'est « que » d'environ 10 000 pour les lymphocytes T CD4⁺. Après activation, les lymphocytes T naïfs, quiescents, changent de façon drastique leur métabolisme en multipliant leur consommation de glucose, d'acides aminées et de fer ⁸⁹. En tant que facteur de croissance des lymphocytes T, l'IL-2 joue un rôle central dans le maintien de cette prolifération. Il est sécrété de façon autocrine dès l'activation du lymphocyte T naïf et son effet est maintenu tout au long de la phase d'expansion clonale. L'expression de l'IL-2 ainsi que celle de la chaîne α de son récepteur, IL-2R α ou CD25, sont induites par les voies de signalisation impliquant le TCR et CD28 ⁸⁸ (Figure 9). CD28 participe plus particulièrement à la transcription du gène de l'IL-2 en stimulant l'activité des facteurs de transcription NFAT, NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) et AP-1 (*Activator Protein 1*). En plus de son rôle transcriptionnel, CD28 est impliqué dans la stabilité des ARNm codant pour l'IL-2 ⁹⁰. L'expression du gène codant CD25 est également dépendante de l'activation des facteurs NF- κ B, NFAT et AP-1 ⁹¹. Les lymphocytes T naïfs

expriment constitutivement un récepteur de faible affinité à l'IL-2 formé de deux chaînes β et γ (IL-2R $\beta\gamma$, $K_d \sim 10^{-9}$ M). Environ 20 heures après activation, les lymphocytes T naïfs induisent à leur surface l'expression de la chaîne α mais à un faible taux (CD25^{low}). L'association des trois chaînes confère au récepteur une très forte affinité pour l'IL-2 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$, $K_d \sim 10^{-11}$ M) ce qui favorise son activation par de faibles quantités d'IL-2. Environ 24 heures après l'activation des lymphocytes T naïfs, l'IL-2 sécrété induit une forte augmentation du taux d'expression de CD25 en activant la voie de signalisation IL-2R $\alpha\beta\gamma$ /STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*). Seuls les lymphocytes T CD25^{high} peuvent alors proliférer⁹². La fixation de l'IL-2 sur son récepteur, IL-2R $\alpha\beta\gamma$, induit la phosphorylation de STAT5 qui alors peut inhiber la transcription du gène de l'IL-2. À l'inverse, la signalisation par le TCR/CD28 inhibe la phosphorylation de STAT5 favorisant une production continue d'IL-2. Environ 48 heures après l'activation des lymphocytes T, l'accumulation d'IL-2 rend la voie IL-2R/STAT5 prépondérante sur la voie TCR/CD28. La production d'IL-2 atteint alors son maximum. Étant donné que la voie IL-2R/STAT5 stimule l'expression de CD25, on observe un épuisement de l'IL-2 dans les 5 jours après activation des lymphocytes T^{87,92} (Figure 9). L'IL-15 produite par les DC semble indispensable pour la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ activés.

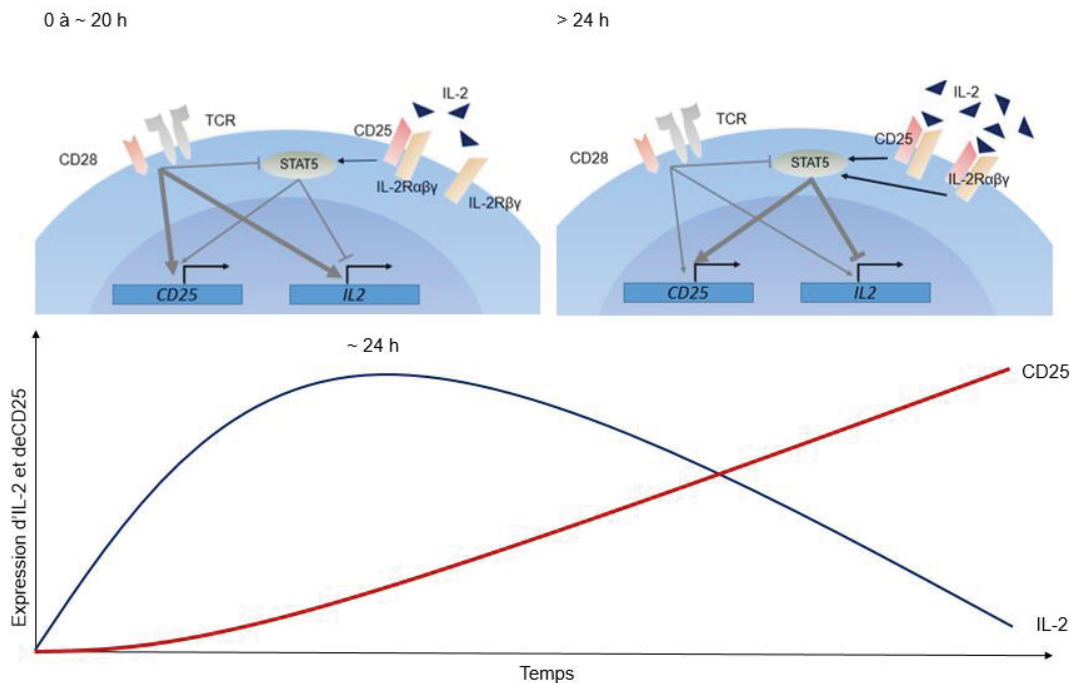


Figure 9 : Rôle des voies TCR/CD28 et IL-2/IL-2R dans l'expansion clonale des lymphocytes T

L'activation par les voies TCR/CD28 induit également l'expression de la molécule CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4* ou CD152) à la surface des lymphocytes T. Comme CD28, elle interagit avec les molécules B7 (CD80 ou CD86) des DC mais avec une affinité bien supérieure. Contrairement à CD28, CTLA-4 est un régulateur négatif de la prolifération des lymphocytes T induite par l'IL-2 dont la fonction est de

terminer la phase d'expansion clonale. La distribution subcellulaire de CTLA-4 est inhabituelle. Environ 90% des molécules sont localisées au niveau intracellulaire. Elles sont endocytées et réexprimées à la membrane cytoplasmique de façon continue. L'activation des lymphocytes T augmente le *turnover* du CTLA-4 à la surface cellulaire tout en maintenant l'endocytose⁹³. Les souris déficientes en CTLA-4 présentent des syndromes auto-immuns très sévères liés à une lympho-prolifération (paragraphe .V.4.d.2, page 69).

.II.2.c Différenciation et fonctions des lymphocytes T effecteurs

.II.2.c.1 Différenciation et fonctions des lymphocytes T cytotoxiques

.II.2.c.1.1 Lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺

Les DC matures sont responsables de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs et de leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques (CTL, *Cytotoxic T Lymphocytes*) grâce à leur capacité à présenter les antigènes de façon directe ou croisée par les molécules de classe I du CMH et à fournir un environnement cytokinique adapté. Environ 5 à 10 % des lymphocytes T CD8⁺ activés se différencieront en lymphocytes T CD8⁺ mémoires. L'infection fournit généralement un contexte inflammatoire suffisant pour permettre l'activation/différenciation des lymphocytes T CD8⁺ indépendamment de l'aide des lymphocytes T *helper*. Les cytokines requises pour la différenciation des CTL sont l'IFN- α/β , l'IL-15 et/ou l'IL-12. L'IL-15 est également impliqué dans la survie des CTL. Les cytokines produites par les DC, suite à l'activation de leurs TLR, varient avec le type d'agent infectieux. Par exemple, l'IL-15 est requis pour induire une réponse lymphocytaire T CD8⁺ contre le HSV mais pas l'IL-12. Quand les signaux inflammatoires exprimés par les DC sont insuffisants (cas du virus HSV), les lymphocytes T *helper* peuvent alors permettre une maturation optimale des DC à travers l'activation de leurs récepteurs CD40^{80,94}.

La sortie des CTL des ganglions lymphatiques et leur migration aux foyers inflammatoires par la circulation sanguine et lymphatique nécessite la réexpression de S1P1 à leur surface⁹⁵. Cette migration est facilitée par le clivage de CD62L, la diminution du taux d'expression de CCR7 à la surface des CTL ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence dont CD44 et PSGL-1 (ligand de la P-sélectine) et des récepteurs CCR5 et CXCR3 pour la chimiokine CXCL9. Au niveau du site infectieux, la seule reconnaissance du peptide antigénique à la surface des cellules cibles par le TCR suffit à activer les fonctions effectrices des CTL. Celles-ci consistent à activer l'apoptose des cellules cibles par les voies Perforine/Granzyme et Fas/Fas ligand (FasL). Les CTL ont également la capacité de sécréter de grandes quantités de cytokines proinflammatoires dont l'IFN- γ et le TNF- α ^{80,96}. L'expression des molécules Perforines et Granzymes dans les CTL (et les NK) est sous le contrôle du facteur de transcription

Eomesodermine (Eomes). L'expression de l'IFN- γ est sous le contrôle d'Eomes et de son paralogue T-bet^{97,98}. D'autre part, le développement de la mémoire immunitaire est couplé avec une augmentation du taux d'expression d'Eomes dans les lymphocytes T CD8⁺ effecteur et d'une diminution du taux d'expression de T-bet^{99,100}. Les lymphocytes T CD8⁺ activés peuvent s'orienter vers soit le stade effecteur (TEC, *terminal effector cell*) soit le stade mémoire (MPC, *memory precursor cell*). Ainsi l'activation de Notch favorise la production de lymphocytes T effecteurs nécessaires pour l'élimination d'une infection aigüe. À l'inverse, un défaut d'activation par les molécules Notch conduit à l'établissement de la mémoire. L'expression de Notch est induite dans les lymphocytes T CD8⁺ naïfs par les cytokines inflammatoires (IFN- α/β) et l'IL-2 grâce à la kinase mTOR et au facteur de transcription T-bet. Ces deux voies de signalisation sont ensuite amplifiées par Notch créant ainsi une boucle d'amplification positive¹⁰¹.

.II.2.c.1.2 Lymphocytes T cytotoxiques CD4⁺

L'existence de CTL de phénotype CD4⁺ est connue depuis plus de trente ans¹⁰². Comme les CTL CD8⁺, leur pouvoir cytotoxique est dépendant des voies Perforine/Granzyme et Fas/FasL. De plus, elles expriment le facteur de transcription Eomes. Bien qu'ils soient majoritairement issus des lymphocytes Th1, ils peuvent également se développer à partir des lymphocytes Th2, Th17 et même Treg. Leur différenciation est favorisée par l'activation des voies de costimulation OX-40/OX-40L et 4-1BB/4-1BBL (CD137/CD137L) ainsi que la présence des cytokines TGF- β , IFN- α/β et IL-2. Ces signaux favoriseraient l'expression des facteurs de transcription Eomes, Runx3 et T-bet et l'inhibition du facteur ThPOK. Le facteur Runx3, qui est exprimé dans les CTL CD8⁺, est inhibé dans les lymphocytes Th par le facteur ThPOK¹⁰³ dans lesquels il est spécifiquement exprimé afin d'inhiber le développement de leurs fonctions cytotoxiques. L'expression antagoniste de ThPOK et Runx3 dicte, non seulement, la stabilité du lignage CD4⁺ et CD8⁺ mais détermine également l'établissement du lignage CTL CD4⁺¹⁰³. Cependant, de nombreuses inconnues demeurent sur la façon dont l'environnement cellulaire et cytokinique contrôle les taux relatifs d'expression de ThPOK et de Runx3 et si l'activation antigénique, des lymphocytes T CD4⁺, participe à ce contrôle. À ce jour, la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD4⁺ a surtout été observée dans des contextes infectieux et s'exercerait contre les CPA présentant des complexes peptides viraux-CMHII¹⁰⁴.

.II.2.c.2 Différenciation et fonctions des lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou iTreg

La phase d'expansion clonale est suivie d'une phase de différenciation en lymphocytes T CD4⁺ effecteurs ou *helper* (Th). Contrairement aux lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ présentent une grande diversité de choix lors de leur différenciation en lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22

ou iTreg, Figure 11, Tableau 1). L'environnement cytokinique présent lors de l'activation par les DC et durant les premières divisions cellulaires des lymphocytes T CD4⁺ dicte principalement la phase de différenciation. Les macrophages inflammatoires participent également à la signature cytokinique. L'intensité du signal transduit par le TCR et la qualité de la costimulation influencent également la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ activés. Par exemple, une faible transduction du signal (peu d'antigènes ou antigènes de faible affinité) associée à une production d'IL-4 induit une différenciation en lymphocyte Th2. À l'inverse, une forte transduction du signal (beaucoup d'antigènes ou antigènes de haute affinité) associée à une production d'IL-12 induit la différenciation en lymphocytes Th1¹¹. Les récepteurs Notch des lymphocytes T CD4⁺, et leurs ligands exprimés par les DC après endocytose des antigènes, participent également à la différenciation en lymphocytes Th. Par exemple, les bactéries ou virus induisent l'expression des ligands Delta-Like 1 et 4 (DLL1 et DLL4) du récepteur Notch 3 à la surface des DC. L'activation du récepteur Notch 3 des lymphocytes T conduit à l'expression du gène codant le facteur de transcription T-bet spécifique des lymphocytes Th1. En cas d'infections parasitaires ou lors de la rencontre d'allergènes ou de toxines, les DC expriment à leur surface les ligands Jagged 1 et 2 des récepteurs Notch 1 et 2. L'activation des récepteurs Notch 1 ou 2 des lymphocytes T conduit à l'expression du gène codant le facteur de transcription GATA3 spécifique des lymphocytes Th2¹⁸ (Figure 10).

La différenciation des lymphocytes CD4⁺ en Th17 nécessite trois étapes : initiation, auto-amplification, stabilisation. Elle est initiée par l'activation des lymphocytes T CD4⁺ en présence de la cytokine immunosuppressive TGF-β et de la cytokine proinflammatoire l'IL-6. La polarisation en lymphocytes Th17 est ensuite amplifiée par la production autocrine de la cytokine IL-21 (induite par l'IL-6) qui est responsable également de l'expression du récepteur à l'IL-23 à leur surface et du facteur de transcription RORγt lui-même nécessaire à la production d'IL-17A et d'IL-17F. L'IL-23 (famille IL-6/IL-12) produite par les DC activées est responsable de la stabilisation du phénotype Th17 et de la survie des cellules¹⁰⁵. Le facteur de transcription STAT3 joue un rôle important dans la mise en place et le maintien du phénotype Th17 en assurant la transduction du signal induit par l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 et donc l'expression de RORγt. Des expériences conduites *in vitro* indiquent que la différenciation en lymphocytes Th17 nécessite une forte transduction du signal par le TCR en plus de la présence des cytokines TGF-β et IL-6¹⁰⁶. Concernant l'implication des récepteurs Notch, il a été montré que l'inactivation de la voie Notch inhibe la polarisation en lymphocytes Th17¹⁰⁷. Cependant, le rôle respectif des différents ligands et récepteurs de la voie Notch demeure discuté¹⁰⁸.

Une activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs par les DC en présence de TGF-β et d'IL-2 induit l'expression du facteur de transcription Foxp3 et leur différenciation en lymphocytes iTreg¹⁰⁹ (Figure 11).

L'importance physiologique des lymphocytes iTregs a été démontrée grâce à des souris déficientes en TGF- β qui présentent un déficit en lymphocytes T régulateurs d'origine périphérique mais pas thymique. Ces souris déficientes en iTreg présentent des infiltrations lymphocytaires dans de nombreux organes et développent des syndromes auto-immuns équivalents à ceux des souris déficientes pour Foxp3¹¹⁰. La voie de signalisation Notch, en synergie avec celle du TGF- β , joue un rôle central dans l'expression du facteur Foxp3 dans les lymphocytes iTreg¹¹¹.

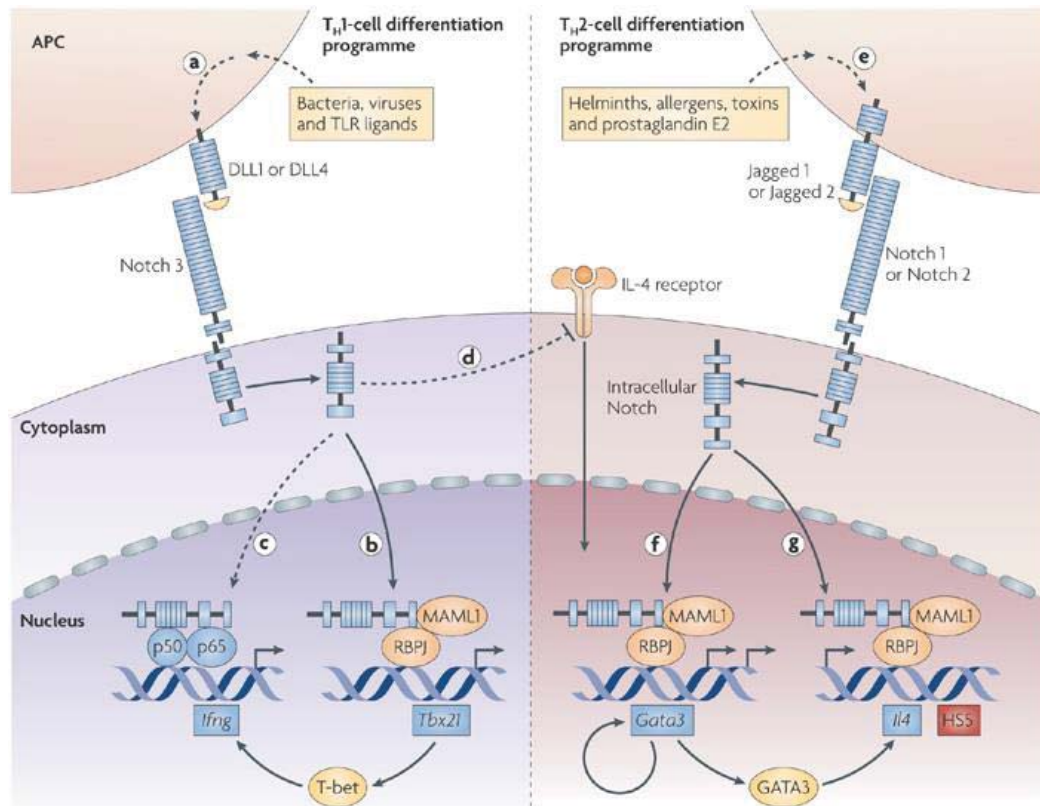


Figure 10 : Rôle de Notch dans la différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2

Les récepteurs Notch sont exprimés à la surface des lymphocytes T sous forme d'hétérodimères constitués d'un domaine extracellulaire lié de façon non-covalente à un polypeptide transmembranaire. L'interaction du récepteur Notch avec ses Ligands DLL ou Jagged exprimés à la surface des CPA activées par l'antigène entraîne un clivage du domaine transmembranaire du récepteur Notch par des métalloprotéases de la famille ADAM libérant sa partie intracellulaire dans le cytosol. Celle-ci migre alors au noyau et interagit avec le complexe complexe formé du facteur de transcription RBPJ et de ses corépresseurs fixés aux promoteurs des gènes cibles de Notch. Le domaine intracellulaire du récepteur Notch déplace les corépresseurs et recrute des coactivateurs comme MAML1 (Mastermind-like 1) afin de déclencher la transcription des gènes cibles.¹⁸

.II.2.c.3 Fonctions des lymphocytes Th1

Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans les réponses immunitaires contre les bactéries et les virus intracellulaires^{112,113} (Figure 11, Tableau 1). Ils expriment le facteur de transcription T-bet responsable

de la production d'IFN- γ ¹¹⁴. Les lymphocytes Th1 qui reconnaissent les complexes peptides-CMHII des macrophages inflammatoires de l'immunité innée ont la capacité de les réactiver et de leurs faire acquérir une très forte activité microbicide afin de permettre une élimination efficace des agents infectieux qu'ils ont phagocytés¹¹⁵. La réponse immunitaire adaptative peut ainsi permettre d'éradiquer les pathogènes qui, en évoluant, sont devenus résistants à l'immunité innée. Les lymphocytes Th1 réactivent les macrophages inflammatoires par des interactions CD40L/CD40¹¹⁶ et par la liaison de l'IFN- γ à son récepteur des macrophages qui stimulent alors : 1) l'expression de l'enzyme oxyde nitrique synthase (iNOS, *Inductible Nitric Oxid Synthase*) dont le produit (monoxyde d'azote) est antiprolifératif et cytotoxique pour les bactéries¹¹⁷, 2) l'expression des récepteurs à Fc à leur surface augmentant ainsi leur capacité de phagocytose et de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*), 3) l'expression des molécules de costimulation dont B7 et la présentation antigénique par les complexes CMH afin d'amplifier la réponse immunitaire adaptative dépendante des lymphocytes T, 4) la sécrétion de cytokines proinflammatoires dont l'IL-12, l'IL-1 et le TNF- α . L'IFN- γ sécrété par les lymphocytes Th1 agit également sur les lymphocytes B permettant une commutation isotypique vers les classes d'anticorps IgG1 et IgG3 (Homme) ou IgG2b et IgG3 (souris) qui fixent le complément favorisant ainsi la cytotoxicité cellulaire et l'opsonisation des agents infectieux et donc l'ADCC¹¹⁸. Les individus atteints de déficiences héréditaires dans le développement ou le fonctionnement des lymphocytes Th1 sont sensibles à certains microbes intracellulaires, normalement inoffensifs, particulièrement les mycobactéries atypiques¹¹⁹.

.II.2.c.4 Fonctions des lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 quant à eux sont impliqués dans la réponse immunitaire antiparasitaire par leur action sur les lymphocytes B, les mastocytes et les polynucléaires éosinophiles^{120,121} (Figure 11, Tableau 1). Le facteur de transcription GATA3 exprimé par les lymphocytes Th2 assure la transcription des gènes codant les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 qui agissent à plusieurs niveaux des réponses antiparasitaires¹²². Au niveau des lymphocytes B, la cytokine IL-4 induit une commutation isotypique vers les classes d'anticorps IgE et IgG1 (souris)¹²³ ou IgG4 (Homme)¹²⁴ ne fixant pas le complément alors que l'IL-5 induit la commutation vers les IgA qui assurent l'immunité des muqueuses^{125,126}. L'IL-6 sécrétée par les lymphocytes Th2 induit la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes¹²⁷ alors que l'IL-5 est responsable de l'activation et la prolifération des polynucléaires éosinophiles¹²⁸. La reconnaissance des vers parasites par les IgE ou les IgG1/IgG4 spécifiques suivie de leur opsonisation par les éosinophiles induit la libération de granules riches en enzymes cytotoxiques pour les parasites (catalases, phospholipidases...) ¹²⁹.

L'IL-4 en association avec L'IL-13 permet également : 1) l'augmentation de la perméabilité épithéliale notamment au niveau des intestins, 2) la production de mucus au niveau des épithéliums¹³⁰, 3) la contraction des cellules musculaires lisses ce qui facilite l'accessibilité des cellules immunitaires au site infectieux¹³¹.

La polarisation des lymphocytes Th0 en Th1 induite par l'IL-12 est dépendante de l'activation du facteur de transcription STAT4 qui lui-même induit l'expression du facteur de transcription T-bet. La polarisation en lymphocyte Th2 induite par l'IL-4 est dépendante de l'activation du facteur de transcription STAT6 qui à son tour active l'expression du facteur GATA3. Les facteurs GATA3 et T-bet ont la capacité d'inhiber mutuellement leur expression ce qui amplifie la polarisation vers l'un ou l'autre des deux types cellulaires^{132,133} (Figure 11, Tableau 1).

.II.2.c.5 Fonctions des lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans l'immunité des muqueuses contre les bactéries extracellulaires et les champignons mais ils sont également présents dans les sites inflammatoires (Figure 11, Tableau 1) d'où leur association aux maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques qui est fréquemment retrouvée dans la littérature. Ils expriment le facteur de transcription ROR γ t responsable de la production d'IL-17A et IL-17F¹³⁴. La cytokine proinflammatoire IL-17 assure le recrutement de polynucléaires neutrophiles au site inflammatoire¹³⁵ et l'expression de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales¹³⁶. Comme mentionné précédemment (page : 30), ils sécrètent également de l'IL-21 afin de maintenir leur phénotype à travers l'expression des récepteurs à l'IL-23. Certaines sous-populations de lymphocytes Th17 expriment également de l'IFN- γ rendant difficile leur distinction avec les lymphocytes Th1¹³⁷. Il est maintenant admis que les lymphocytes Th17 regroupent des sous-populations aux potentiels inflammatoires différents allant de cellules qui possèdent de faibles capacités inflammatoires à des cellules qui sécrètent du GM-CSF et de l'IFN- γ et qui sont fortement inflammatoires. De plus, les lymphocytes Th17 sont dotés d'une très grande plasticité leur permettant de se différencier en lymphocytes Th1, iTreg ou Tfh aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques¹³⁸.

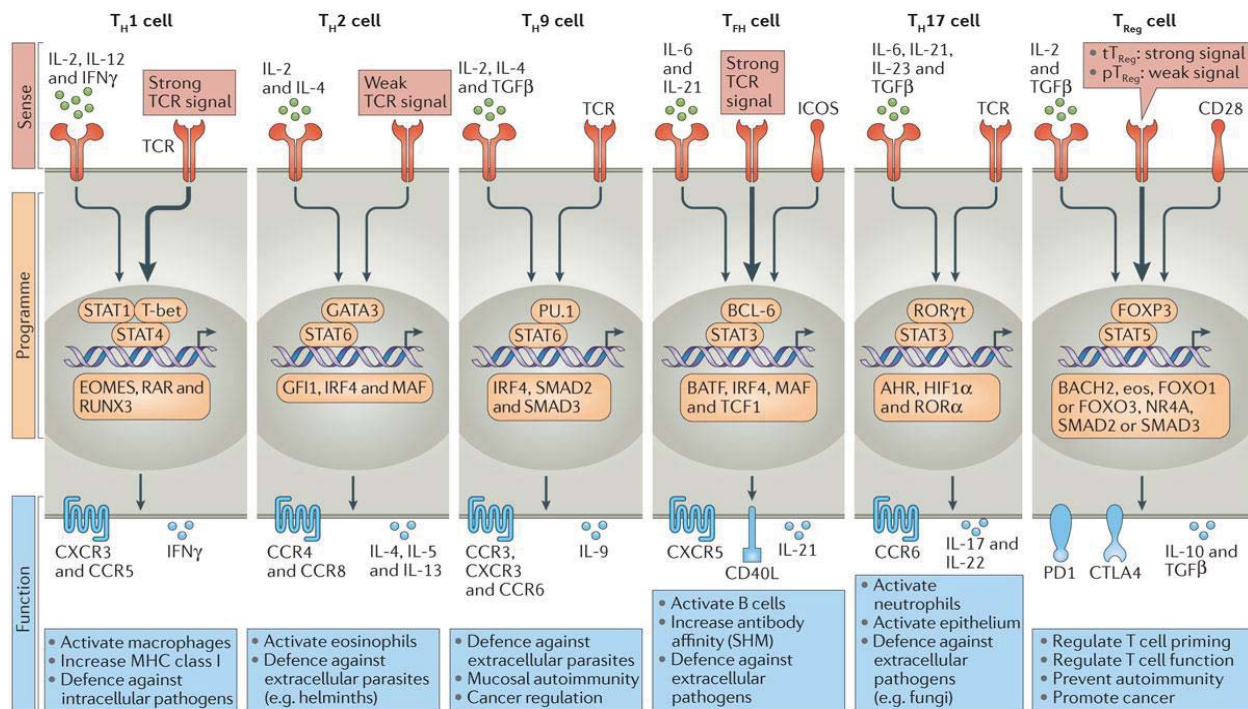


Figure 11: Différenciation et polarisation des lymphocytes T CD4⁺ en sous-populations effectrices

Les différentes sous-populations de lymphocytes T helper se distinguent par : **1)** l'intensité de la signalisation par le TCR et l'environnement cytokinique lors de l'activation (rouge) ; **2)** les facteurs de transcription induits par les voies de signalisation activées en 1) (orange), **3)** les cytokines et récepteurs aux chimiokines induits par les facteurs de transcription activés en 2) (bleu), **4)** les fonctions effectrices induites par les cytokines produites en 3) (encadré bleu). Les récepteurs aux chimiokines induits en 3) assurent la migration des lymphocytes Th vers le site infectieux. ¹¹

II.2.d Molécules de costimulation dans la différenciation des lymphocytes T

À côté des molécules B7/CD28 et CD40/CD40L, de nombreuses autres molécules de costimulation sont impliquées dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ (Figure 8).

II.2.d.1 Molécules de costimulation ICOS/ICOSL

La molécule de costimulation ICOS (CD278) appartient à la famille du CD28. Son activation n'induit cependant pas la production d'IL-2. ICOS est peu exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs et son expression est induite par l'activation des voies TCR/CD28 ^{139,140}. Il est alors fortement exprimé à la surface des lymphocytes T effecteurs, notamment Tfh et Treg, et des lymphocytes T mémoires. Son ligand ICOSL (B7RP-1/CD275) est exprimé constitutivement par les DC, les lymphocytes B ainsi que certains tissus non hématopoïétiques ⁵. La voie ICOS/ICOSL joue un rôle essentiel dans les réponses des lymphocytes B contre les antigènes de type thymo-dépendant. Ainsi, la déficience en ICOS entraîne une absence de centres germinatifs dans la rate et de commutation de classe des immunoglobulines ^{139,141}. Elle est également

responsable d'un défaut de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en T *helper* et de leur survie, en particulier, pour les lymphocytes Th2 et nTreg. Il a également été montré que la voie ICOS/ICOSL est impliqué dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1, Th2, Th17 et Tfh^{5,139,142-146}. Malgré l'expression d'ICOS sur les lymphocytes T CD8⁺ activés, son rôle dans leur différenciation est peu étudié.

Tableau 1 : Caractéristiques fonctionnelles des différentes sous-populations lymphocytaires T

Lymphocyte T	Signaux de différenciation	Facteurs de transcription	Molécules sécrétées	Récepteurs de migration	Cellules cibles	Fonctions immunitaires activées
Th1	IL-12, IFN- γ	T-bet	IFN- γ	CXCR3	Macrophages Lymphocytes B	- Commutation de classes - Fonctions microbicides des macrophages contre les bactéries et virus intra cellulaires
Th2	IL-4	GATA3	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13	CCR4, CCR8	Éosinophiles Lymphocytes B	- Commutation de classes - Mort des parasites (helminthes) par dégranulation
Th17	IL-6, TGF- β , IL-21, IL-23, IL-1 β	ROR γ t	IL-17, IL-22	CCR6, CCR4	Neutrophiles Cellules épithéliales	Élimination des champignons et bactéries extracellulaires
Th9	IL-4, TGF- β	PU.1	IL-9	CCR3, CXCR3, CCR6	Mastocytes	Élimination des parasites (helminthes)
Th22	IL-6, TNF- α	AhR	IL-22	CCR10, CCR6	Épithéliums	Immunité cutanée
Tfh	IL-21	Bcl-6	IL-21	CXCR5	Lymphocytes B	- Commutation de classes - Mutation somatique des régions VH/VL des Ig - Élimination des pathogènes extracellulaires
Treg	TCR, TGF- β	Foxp3	TGF- β , IL-10, IL-35	CCR7, CCR6, CX3CR1	CPA Lymphocytes T	Régulation négative de la réponse immunitaire
CTL	IFN- α/β , IL-15, IL-12	Eomes	IFN- γ	CXCR3, CCR5	Cellules infectées par des virus Cellules tumorales	Apoptose par les voies Perforine/Granzyme et Fas/FasL

.II.2.d.2 Molécules de costimulation OX-40/OX-40L

La molécule de costimulation OX-40 (CD134) appartient à la famille du TNFR. Elle est absente des lymphocytes T conventionnels CD4⁺ et CD8⁺ au stade naïf, effecteur ou mémoire. En revanche, elle est exprimée de façon transitoire par les lymphocytes T récemment activés par les voies TCR/CD28. Son ligand OX-40L (CD252), qui appartient à la famille des TNF, est induit sur les DC, les lymphocytes B et les macrophages après activation par les TLR ou CD40¹⁴⁷. Les lymphocytes T déficients en OX-40 se divisent normalement mais ne sont pas capables de maintenir cette capacité au cours du temps et meurent. La voie OX-40L/OX-40 prolonge la phase d'expansion clonale grâce à l'expression de la protéine Survivin¹⁴⁸ ainsi que la survie des lymphocytes T en induisant l'expression des molécules antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL^{149,150}. Bien qu'elle soit impliquée dans la survie des lymphocytes Th1 et Th2, elle ne participe qu'à la

différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th2 en induisant l'expression de l'IL-4 et en inhibant celle de l'IFN- γ ¹⁵¹⁻¹⁵³. La voie OX-40/OX-40 est également impliquée dans la survie des Tregs¹⁵⁴ mais semble influencer négativement le développement des iTreg puisque, lors de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺, la stimulation d'OX-40 inhibe l'expression de Foxp3^{155,156}. Son implication dans leurs fonctions effectrices reste encore débattue.

.II.3 Régulation de la réponse immunitaire

.II.3.a Lymphocytes T régulateurs CD4⁺

Les lymphocytes Treg représentent 5 à 10 % des lymphocytes T CD4⁺. Ils interviennent dans l'induction de tolérance au soi, aux aliments, aux microbiotes et dans la régulation négative de la réponse inflammatoire. Ils inhibent l'activation et la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de cytokines et l'expression des molécules de costimulation à la surface des APC et induisent l'anergie des lymphocytes T et B¹⁵⁷. Leur origine peut être thymique (nTreg, paragraphe .I.2.c.1, page 19) ou périphérique lors d'une réponse immunitaire (iTreg). Les lymphocytes Treg expriment spécifiquement le facteur de transcription Foxp3 (Figure 12), sécrètent les cytokines TGF- β , IL-10 et IL-35 et expriment des taux élevés en récepteurs CD25 (IL-2R α) et en molécules de co-inhibition CTLA-4. En revanche, ils expriment peu ou pas le récepteur CD127 (IL-7R α). Les lymphocytes Treg expriment des taux élevés en ecto-ATPases CD73 et CD39 qui catalysent l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en adénosine qui est inhibiteur des lymphocytes T effecteurs et un inducteur d'anergie¹⁵⁸. De façon intéressante, il a été observé qu'une fraction des lymphocytes Treg Foxp3⁺ sont capable d'éliminer des cellules NK et des CTL par la voie Perforine/Granzyme¹⁵⁹ (Figure 12). La déficience en lymphocytes Treg entraîne le développement de syndromes auto-immuns, d'allergies et un vieillissement accéléré^{160,161}. Leur absence peut également causer des troubles de fertilité et de grossesse. À l'inverse, une activité Treg excessive favorise le développement de cancers et de maladies infectieuses¹⁶¹.

Certaines sous-populations de lymphocytes T TCR $\alpha\beta^+CD8^+CD28^-$, de lymphocytes T $\gamma\delta$, de lymphocytes NKT, de lymphocytes B régulateurs, de macrophages (MDSC, *Myeloid Derived Suppressor Cells*) et de DC jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire en sécrétant les cytokines IL-10, IL-35 et/ou TGF- β ou en exprimant les molécules de co-inhibition comme CTLA-4¹⁶¹.

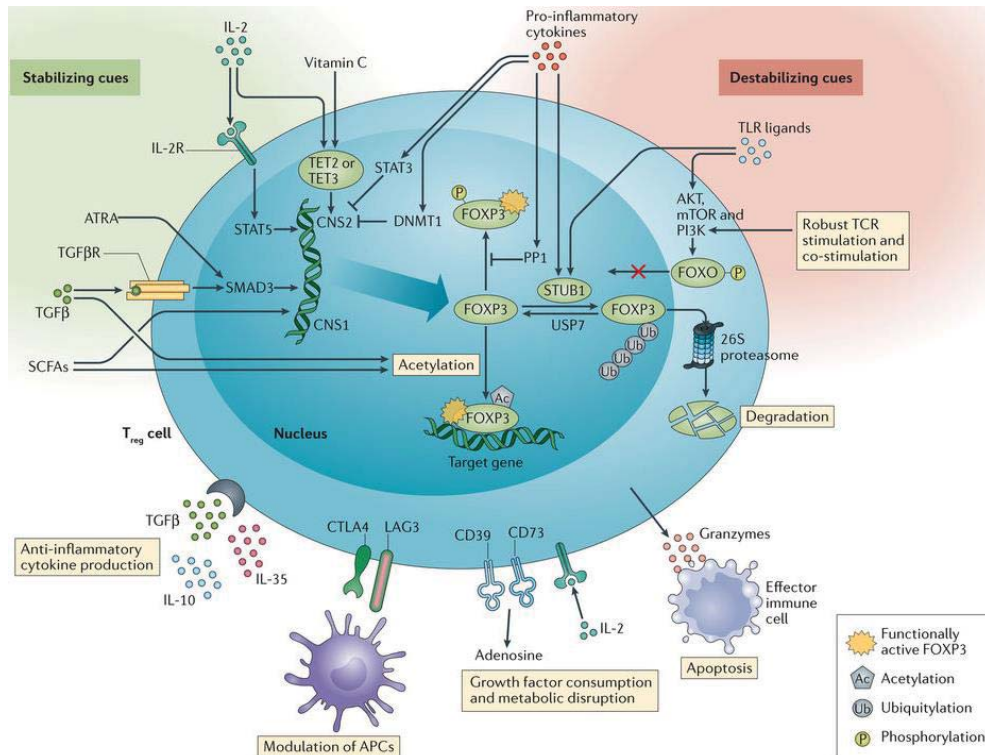


Figure 12 : Induction et fonctions du facteur de transcription *Foxp3* spécifique des lymphocytes Treg

L'induction du facteur de transcription *Foxp3* et le maintien de son expression sont contrôlés par les cytokines TGF- β et IL-2 ainsi que par des facteurs de l'environnement tissulaire tel que l'acide rétinoïque et les acides gras à chaîne courte. À l'inverse le facteur *Foxp3* est régulé négativement par les cytokines proinflammatoires TNF- α et IL-6 ainsi que par l'activation des TLR ou une forte stimulation des voies TCR et de costimulation. L'expression du facteur *Foxp3* par les lymphocytes Treg est responsable de la production de cytokines anti-inflammatoires, de l'expression des récepteurs CTLA-4 et CD25 et de la mort des effecteurs immunitaires.¹³

.II.3.b Cellules dendritiques tolérologènes

Les cellules dendritiques sont une population hétérogène de CPA jouant un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire. Elles peuvent déclencher une réponse inflammatoire en activant les lymphocytes T et en sécrétant des cytokines inflammatoires ou peuvent l'atténuer en induisant un état de tolérance ou d'anergie des lymphocytes T ou leur différenciation en lymphocytes iTreg^{162,163}. En plus de la présentation antigénique des agents pathogènes, certaines DC peuvent jouer un rôle dans le maintien de la tolérance centrale et périphérique. Les DC tolérologènes présentent peu de molécules de costimulation à leur surface et sécrètent des quantités importantes de cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10 et le TGF- β . Suite à la présentation des antigènes du soi, dérivés par exemple des corps apoptotiques, les DC tolérologènes peuvent désactiver les lymphocytes T autoréactifs et induire la conversion des lymphocytes T en iTreg grâce à la sécrétion de TGF- β ^{163,164} (Figure 11). Ainsi, les DC CD103⁺ sont capables en présence de TGF- β et d'acide rétinoïque d'induire la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en iTreg puis leur migration

vers l'intestin grâce à l'expression des molécules de migration CCR9 et $\alpha 4\beta 7$ ¹⁶⁵. Elles sont également capables d'induire la différenciation en lymphocytes T CD8⁺ sécréteurs d'IL-10. Les pDC (Cellules Dendritiques plasmacytoïdes) peuvent être impliquées dans l'atténuation de l'inflammation en cas d'asthme et d'allogreffes chez la souris^{166,167}.

.II.4 Marqueurs phénotypiques dans la différenciation des lymphocytes T

La variation du taux d'expression en molécules de surface CD44, CD45RA/CD45RB, CD127, CD62L, CCR7 et KLRG1 est communément utilisée pour différencier les différents stades d'activation et de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Ces marqueurs ont des fonctions physiologiques très différentes. Ainsi, la phosphatase de membrane CD45RB (souris) ou CD45RA (Homme) est impliquée dans les premières étapes d'activation des lymphocytes T par le TCR et la désactivation des récepteurs aux cytokines. CD44 et CD62L sont des protéines d'adhérence impliquées dans la migration vers les organes lymphoïdes secondaires ou les sites inflammatoires. KLRG1 (Killer cell *Lectin Like Receptor subfamily G member 1*) est un récepteur d'adhérence dont l'activation régule négativement la production de cytokines et le pouvoir cytotoxique des lymphocytes T grâce à la présence d'un motif ITIM. Il est également un marqueur de sénescence¹⁶⁸. CCR7 est un récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21 impliqué dans le *homing* des lymphocytes T (paragraphe .II; Page 23). CD127 est la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-17R α) impliqué dans la survie des lymphocytes T immatures et matures.

.II.4.a CD45RA/CD45RB et CCR7

Au stade naïf, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ expriment un taux élevé de CD45RA ou CD45RB (CD45RA^{high} ou CD45RB^{high}) et de récepteurs CCR7. Après activation des lymphocytes T CD4⁺, ces taux diminuent à chaque division cellulaire de la phase d'expansion clonale pour atteindre des niveaux faibles (CD45RA^{low} ou CD45RB^{low}CCR7⁻) au stade effecteur⁶ (Figure 13 ; Tableau 2).

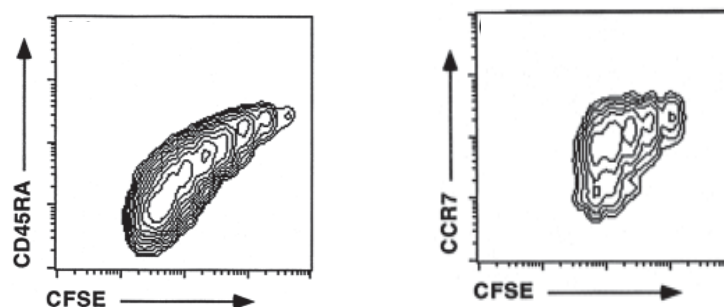


Figure 13 : Taux d'expression en CD45RA et CCR7 au cours de l'expansion clonale des lymphocytes T
Adapté de Ma et al, 2004.⁶

.II.4.b CD62L

La molécule CD62L est également fortement exprimée à la surface des lymphocytes T naïfs et des lymphocytes T mémoires centraux (CM, *Central Memory*). Cette expression chute drastiquement après activation par la voie du TCR suite à son clivage par des métalloprotéases de membrane de la famille ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) dont ADAM10 et 17²⁴. Cette activité protéolytique est dépendante de l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ cytosolique et de l'activation de la kinase Zap70 (Tableau 2).

.II.4.c CD44

La molécule CD44 est peu exprimée à la surface des lymphocytes T naïfs (CD44^{low}). Son taux augmente lors de l'activation antigénique des lymphocytes T et atteint son maximum aux stades effecteur et mémoire (CD44^{high})⁹. CD44 joue un rôle important dans l'adhérence des lymphocytes T effecteurs à la matrice extracellulaire des tissus enflammés par sa capacité à interagir avec un de ses principaux composants, l'acide hyaluronique (Figure 14). CD44 semble également pouvoir interagir avec des molécules d'acide hyaluronique exprimées par l'endothélium vasculaire lors d'une inflammation⁹ (Tableau 2).

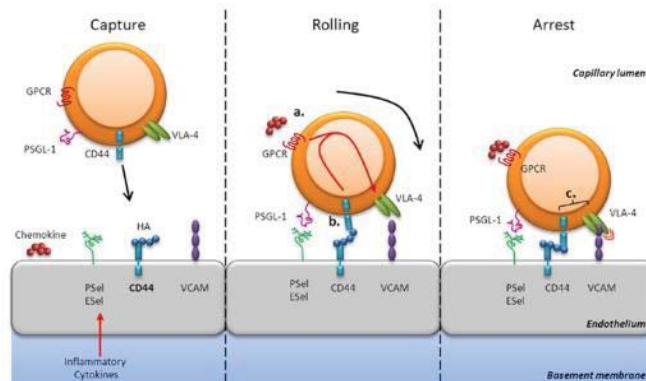


Figure 14: Rôle de CD44 dans la migration des lymphocytes T aux sites inflammatoires
Adapté de Baaten et al, 2012.⁹

.II.4.d CD127 et KLRG1

À la fin de la phase d'expansion clonale, les lymphocytes T CD44^{high}CD62L⁻ présentent des phénotypes hétérogènes qui ont été plus particulièrement étudiés dans les lymphocytes T CD8⁺. Cette hétérogénéité est mise en évidence par l'expression de CD127 et KLRG1.

.II.5 Phénotype des lymphocytes T effecteurs

Le phénotype CD44^{high}CD62L⁻CD127⁻KLRG1⁻ est caractéristique des lymphocytes T effecteurs précoces (EEC, *Early Effector Cells*). La majorité des EEC se différencient en lymphocytes T CD44^{high}CD62L⁻KLRG1⁺CD127⁻ appelées SLEC (*Short-Lived Effector Cells*) ou lymphocytes T effecteurs terminaux^{79,169}. Les lymphocytes T SLEC meurent rapidement en fin de réponse immunitaire à cause de leur faible capacité à se différencier en lymphocytes T mémoires. Les lymphocytes T EEC capables d'exprimer le récepteur à l'IL-7, CD127, se différencieront en précurseurs des lymphocytes T mémoires à longue durée de vie (MPEC, *Memory Precursor Effector Cells*) de phénotype CD44^{high}CD62L⁻KLRG1⁻CD127⁺. Les sous-populations SLEC et MPEC présentent des fonctions effectrices identiques dont la production d'IFN-γ et le pouvoir cytotoxique (Fas/FasL et Perforine/Granzyme). Enfin, les lymphocytes T EEC capables d'exprimer simultanément KLRG1 et CD127 se différencient en lymphocytes T DPEC (*Double Positive Effector Cells*) de phénotype CD44^{high}CD62L⁻KLRG1⁺CD127⁺. Ils se caractérisent par la sécrétion des cytokines proinflammatoires et une capacité supérieure à celle des lymphocytes T SLEC à se différencier en lymphocytes T mémoires^{79,169,170} (Tableau 2).

Tableau 2: Taux d'expression des marqueurs d'activation ou de différenciation des lymphocytes T conventionnels

	Naïf	Récemment Activé	Effecteur				Mémoire			
			EEC	SLEC	MPEC	DPEC	EM	CM	EMRA	RM
CD45RA/RB	high	high	low	low	low	low	low/high	low/high	high	/
CD44	low	low	high	high	high	high	high	high	high	high
CD69	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
CD25	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CD62L	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
CCR7	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
CD127 (IL-7Rα)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
KLRG1	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

D'après Obar *et al*, 2011¹⁶⁹; Kobayashi *et al*, 2015 et Li *et al*, 2017⁷⁹.

En cas de déficience en facteur de transcription Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*), les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs produisent moins de SLEC et plus de MPEC au cours d'une infection aiguë. Le facteur de transcription Blimp-1, dont l'expression est dépendante de l'activation antigénique en présence d'IL-2, joue alors un rôle important dans l'orientation des lymphocytes T CD8⁺ vers un phénotype effecteur de type SLEC¹⁷¹. Les lymphocytes T effecteurs déficients en Blimp-1 produisent

moins de granzyme B et plus d'IL-2 et de TNF- α , un phénotype en accord avec leur différenciation en MPEC ¹⁷².

.II.6 Phénotype des lymphocytes T mémoires

Les lymphocytes T MPEC et une partie des lymphocytes T DPEC se différencient en deux sous-populations de lymphocytes T mémoires (CD44^{high}KLRG1⁻CD127⁺) aux capacités migratoires différentes selon le niveau d'expression des récepteurs CCR7 et de CD62L : une sous-population mémoire centrale (CM, *Central Memory*) qui exprime CD62L et CCR7 et une sous-population effecteur mémoire (EM, *Effector Memory*) qui n'exprime que CCR7 ^{79,173} (Tableau 2). Certaines études suggèrent que les lymphocytes T EM dérivent majoritairement des lymphocytes T DPEC. Plus récemment, des lymphocytes T mémoires, de phénotype CD44^{high}KLRG1⁻CCR7⁻CD69⁺, ont été décrits comme résidant dans les tissus non lymphoïdes (RM, *Resident Memory*). Leur origine exacte reste à déterminer bien que pouvant dériver des trois sous-populations MPEC, SLEC et DPEC ^{79,174,175}. Lors d'une réponse immunitaire secondaire, les lymphocytes T CM sont retenus dans les organes lymphoïdes secondaires et constituent une source renouvelable de lymphocytes T effecteurs alors que les lymphocytes T EM et RM représentent la première ligne de défense de l'immunité adaptative contre une réinfection grâce à leur rapidité d'expansion clonale et de mise en place des fonctions effectrices ¹⁷⁶. Dans les lymphocytes T CD8⁺ mémoires, le taux d'expression de CD45RB/RA est discuté. Certaines études considèrent que les lymphocytes T CD8⁺ mémoires présentent les deux phénotypes CD44^{high}CD45RB^{high} et CD44^{high}CD45RB^{low} ¹⁷⁷ correspondant, respectivement, aux lymphocytes T CD8⁺ CM et EM alors que d'autres études montrent que la quasi-totalité des lymphocytes T CD8⁺ mémoires CD44^{high} présente des taux élevés de CD45RB, qu'ils soient CM ou EM ^{178,179}. Une sous-population de lymphocytes T EM exprimant CD45RA (T EMRA, *Effector Memory Reexpressing CD45RA marker*) a été mise en évidence chez l'Homme en cas d'infection chronique ^{180,181}. Les lymphocytes T EMRA expriment des taux faibles en molécules de *homing* CD62L et CCR7 (CD44^{high}CD45RA^{high}CD62L⁻CCR7⁻) et en molécules de costimulation CD28 et CD27 ¹⁸². Cette sous-population de lymphocytes T présente des signes de sénescence dont le raccourcissement des télomères, un pouvoir prolifératif réduit et une résistance à la mort cellulaire. Les CTL de phénotype EMRA présentent des capacités effectrices plus importantes que les CTL de phénotype effecteur grâce à des productions plus élevées de Perforine/Granzyme et d'IFN- γ ¹⁸¹.

.II.7 Phénotype des lymphocytes T résidants mémoires

Les lymphocytes T résidants mémoires (T RM), essentiellement définis par l'expression du marqueur de surface CD103, représentent un sous-ensemble de lymphocytes T mémoires résidant dans les tissus et peu présent au niveau sanguin ¹⁸³. L'identification de facteurs de transcription spécifiques nécessaires à leur différenciation, tels que Hobit et Blimp1 ¹⁸⁴, a confirmé le fait que les lymphocytes T RM constituent une lignée de lymphocytes T à part entière. Ils dérivent des précurseurs lymphocytaires T SLEC et MPEC ¹⁸⁵. Les lymphocytes T RM CD8⁺ sont hautement protecteurs lors de réinfections locales par leur fort pouvoir cytotoxique contre les cellules infectées et leur capacité à produire des cytokines et chimiokines capables d'amplifier le recrutement de cellules de l'immunité innée et adaptative ^{186,187}. Dans les cancers, l'interaction de l'intégrine CD103 avec son ligand, l'E-cadhérine, favorise l'adhésion des lymphocytes T RM aux cellules épithéliales tumorales ce qui potentialise leur pouvoir cytotoxique et leur production de cytokines ^{183,188,189}. L'infiltration des tumeurs par des lymphocytes T RM est corrélée à une meilleure survie dans plusieurs types de cancers humains ^{190,191}.

.II.8 Phénotype des lymphocytes T *exhausted*

En cas d'infection chronique ou de cancer, les lymphocytes T sont exposés de façon continue à des antigènes et des signaux inflammatoires ce qui induit l'émergence d'une population de lymphocytes T à un stade de différenciation appelé *exhausted* ¹⁹². Ces lymphocytes T présentent un phénotype semblable à celui des lymphocytes T EM (CD44^{high}CD62L⁻) mais ont perdu la capacité de proliférer et de se réactiver en présence d'antigènes. Ils se caractérisent par l'expression à leur surface de taux élevés de molécules de coinhibition PD-1 (*Programmed cell Death 1*), TIM-3, CTLA-4 et LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene 3*) ¹⁹³. Dans les lymphocytes T CD8⁺, l'ectonucléotidase de membrane CD39 semble être également un marqueur de ce stade de différenciation ¹⁹⁴. De plus, les lymphocytes T *exhausted* perdent la capacité à produire de l'IL-2 et de l'IFN-γ et également la granzyme B dans le cas des CTL et donc leur pouvoir cytotoxiques ^{192,193}. Cette sous-population lymphocytaire T est particulièrement étudiée dans le cadre de l'immunité antitumorale et ses marqueurs sont ciblés lors des biothérapies anti-cancéreuses ¹⁹⁵.

.III Apoptose et homéostasie des lymphocytes T

Le nombre de lymphocytes T présents chez un individu est maintenu constant au cours du temps. Il résulte d'un équilibre entre les taux : 1) de lymphopoïèse thymique qui décroît avec l'âge, 2) de division continue des lymphocytes T mémoires qui croît avec l'âge, 3) d'expansion clonale des lymphocytes T activés

par l'antigène, 4) de mort cellulaire des lymphocytes T effecteurs. Comme mentionné précédemment, l'autophagie est impliquée dans le développement thymique des lymphocytes T (Figure 2). Elle joue également un rôle important dans la survie à long terme des lymphocytes T CD8⁺ mémoires. Une forte activité autophagique est induite dans les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs lors de la transition vers le phénotype mémoire ¹⁹⁶. L'apoptose des lymphocytes T effecteurs a été initialement corrélée à la diminution dans leur milieu du taux de cytokines assurant leur survie (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15) ^{197,198}. Il a ensuite été montré que cette mort par défaut de facteurs de croissance concerne essentiellement les lymphocytes T qui sont éliminés après une seule activation par l'antigène (réponse primaire). Elle est dépendante de l'activation des molécules pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, de type BH3-only, Bim et Puma ¹⁹⁹. Actuellement, on considère que les mécanismes responsables de la mort cellulaire des lymphocytes T effecteurs diffèrent avec le nombre de fois où ils ont été activés par leur antigène spécifique. Lorsque la mort survient après une activation répétée ou chronique par le même antigène (réponse secondaire), la voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort Fas/FasL (AICD, *Activation Induced Cell Death*) est alors indispensable pour le maintien de l'homéostasie ^{79,200} (Figure 15 ; Figure 16). D'autres études suggèrent que les mécanismes de mort varient également avec la sous-population de lymphocytes T. Ainsi, il a été montré que l'homéostasie des lymphocytes Th2 est dépendante de la Granzyme B ²⁰¹.

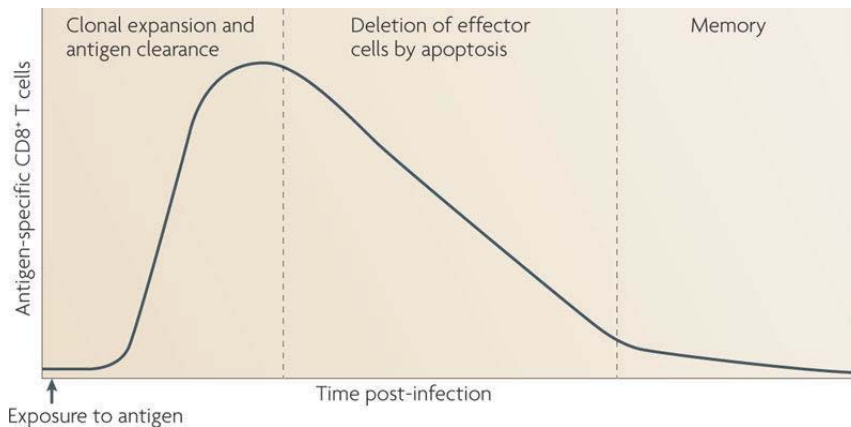


Figure 15: Évolution au cours du temps du nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un peptide viral
Adapté d'après Bouillet et al, 2009. ¹⁷

.III.1 Voie intrinsèque Bim

La protéine pro-apoptotique Bim est impliquée dans la mort cellulaire au cours de nombreux processus biologiques comme le développement embryonnaire ou suite à un stress cellulaire comme une irradiation, une restriction en facteurs de croissance ou la présence de molécules cytotoxiques. En plus de son rôle dans le développement thymique des lymphocytes T (partie : I, page : 15), Bim joue un rôle

important dans l'homéostasie des lymphocytes T en périphérie (Figure 17). Des souris déficientes pour Bim ($Bim^{-/-}$) présentent une accumulation importante de lymphocytes B et T matures et développent des syndromes auto-immuns sévères^{39,202}. De façon paradoxale, ces souris accumulent massivement des lymphocytes Treg $Foxp3^+$ qui peuvent représenter jusqu'à 25% des lymphocytes T $CD4^+$ ²⁰³. Bim est donc responsable de la contraction du pool de lymphocytes T $CD4^+$ effecteurs spécifiques de l'antigène après une réponse immunitaire primaire ainsi que des lymphocytes Treg. Dans les lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs, Bim est impliqué dans la contraction du pool des lymphocytes T MPEC et SLEC. Il est donc responsable de l'élimination des lymphocytes T effecteurs terminaux et de la régulation de la différenciation en lymphocytes T mémoires⁷⁹. La déficience en Bim n'affecte pas les fonctions effectrices des lymphocytes T en réponse primaire et peut même prolonger la durée pendant laquelle elles s'exercent entraînant une réponse secondaire exacerbée à cause de l'augmentation du nombre de lymphocytes T mémoires en réponse primaire^{202,204}. La mort cellulaire dépendante de la molécule Bim implique la perméabilisation des membranes mitochondriales externe par les protéines de la famille Bcl-2, Bax et Bak, afin de libérer le cytochrome c indispensable pour la formation de l'apoptosome dont la fonction est d'activer la pro-caspase 9. Celui-ci est composé de l'adaptateur APAF1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor 1*), du cytochrome c et de la pro-caspase 9. Les caspases initiateuses 9 activées induisent l'apoptose en activant les caspases effectrices 3/6/7. L'expression et l'activité de Bim sont contrôlées au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel ainsi que par la production de différentes isoformes au potentiel pro-apoptotique différent. L'isoforme Bim_{EL} (Extra Long, 196 et 198 aa pour la souris et l'Homme) est la plus abondante dans les thymocytes et les lymphocytes T alors que l'isoforme Bim_S (Short, 108 et 110 aa pour l'Homme et la souris) est quasiment indétectable²⁰⁵. Son expression est régulée par différents facteurs de transcription qui stimulent ($Foxo3a$, $E2F1$) ou inhibent ($Irf4$) son expression. De nombreux microARN (miR) participent également à la régulation négative de l'expression de Bim. Ainsi, des souris présentant une expression accrue du cluster miR-17-92 dans les lymphocytes développent un syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité et meurent prématurément²⁰⁶. Dans les lymphocytes T, l'activation de la kinase AKT par les cytokines réduit l'activité de $Foxo3a$ et donc l'expression de Bim. De même, les miR qui régulent négativement l'expression de $Foxo3a$, tels que miR-182 ou miR-155, peuvent induire une diminution de l'expression de Bim et conduire à un syndrome lymphoprolifératif²⁰⁷. Le facteur $Irf4$ réprime l'expression du gène codant Bim dans les lymphocytes T $CD8^+$ activés²⁰⁸. L'activation des lymphocytes T par la voie TCR induit l'activation du facteur de transcription $E2F1$ impliqué dans l'AICD et l'expression de Bim⁷⁹. Au niveau post-traductionnel, les MAP kinases Erk et JNK régulent l'activité de Bim par la phosphorylation de plusieurs résidus ce qui favorise son association avec l'inhibiteur Bcl-2 ou sa dégradation par le protéasome^{209,210}.

Dans le thymus, la déficience en Bim peut être compensée par d'autres molécules pro-apoptotiques de la famille BH3-only dont Puma. Cependant, les souris Puma^{-/-} possèdent un nombre normal de lymphocytes T. De façon intéressante, la double déficience en Bim et Puma exacerbe la lymphadénopathie et l'hyperplasie thymique sans pour autant amplifier l'auto-immunité²¹¹ (Tableau 4). À l'inverse, une double déficience en Bim et Fas (Bim^{-/-} et mutation *lpr* du gène *fas*) amplifie l'auto-immunité parallèlement à la lymphoaccumulation¹⁷. Bim peut également agir de concert avec la molécule pro-apoptotique Bmf (BH3-only) dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire et le contrôle de l'auto-immunité. Ainsi, une double déficience en protéines Bim et Bmf dans le fond génétique B6 conduit à une lymphoaccumulation, essentiellement de lymphocytes B, et une glomérulonéphrite auto-immune²¹². Dans les lymphocytes Th1 activés à plusieurs reprises par l'antigène, la transcription du gène *Bim* est négativement régulée par le miR-148a ce qui favorise la persistance des lymphocytes Th1 spécifiques de l'antigène dans des réactions immunitaires de longue durée. L'expression de miR-148a est induite par les facteurs de transcription T-bet et Twist1. Les lymphocytes T de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde présentent des taux plus élevés de miR-148a que ceux d'individus sains²¹³.

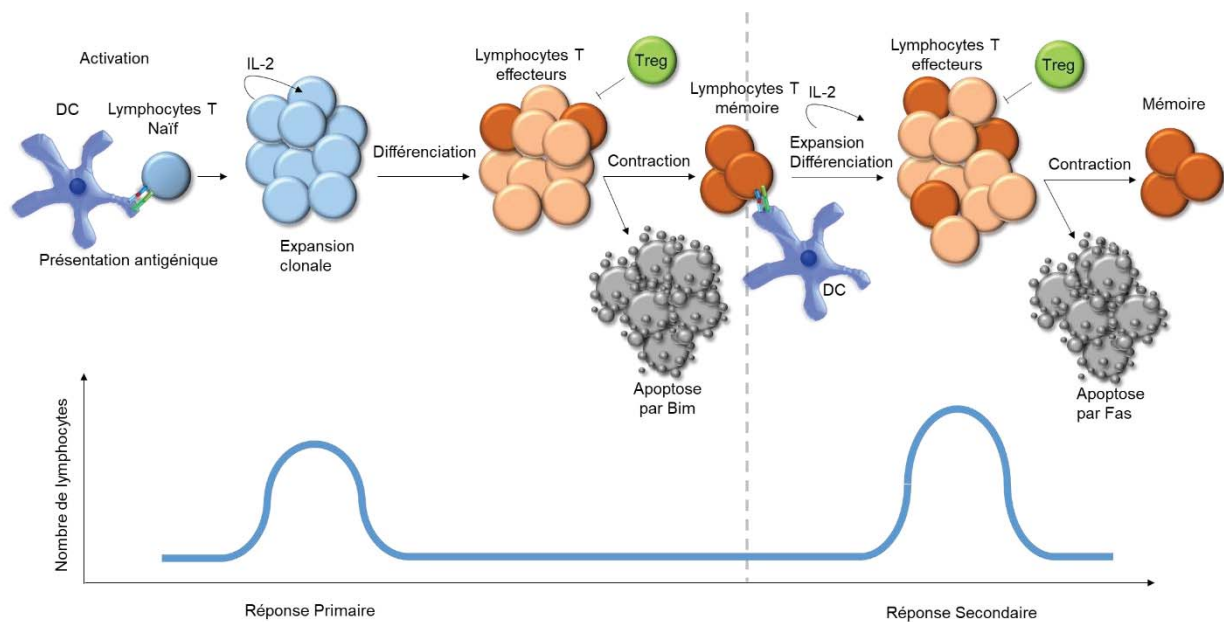


Figure 16 : Étapes clés du maintien de l'homéostasie des lymphocytes T en réponse primaire et secondaire

.III.2 Voie extrinsèque Fas/FasL

Le récepteur de mort Fas/CD95/Apo1/TNFRsf6 est un membre de la famille des TNFR1. C'est un récepteur transmembranaire de type I exprimé à la membrane sous forme d'homotrimer grâce à la présence dans la région N-terminale du domaine PLAD (*Pre-Ligand Assembly Domain*)^{214,215}. La partie intracellulaire de Fas contient le *Death Domain* (DD) responsable de la transduction du signal de mort²¹⁶.

Son ligand FasL/CD95L est un récepteur transmembranaire de type II qui appartient à la famille des TNF ²¹⁷. Il est également exprimé à la membrane sous forme d'homotrimère ²¹⁸. Comme tous les membres de la famille du TNF, il peut se trouver sous forme transmembranaire ou soluble après clivage par des métalloprotéases de membrane ²¹⁹. La stimulation du récepteur Fas par son ligand membranaire induit un changement conformationnel permettant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*Fas Associated Death Domain*) au niveau du DD de Fas par homologie des séquences protéiques ²²⁰. En plus du DD, FADD possède un *Death Effector Domain* (DED) responsable du recrutement des pro-caspases initiatrices 8 et/ou 10 (absente chez la souris) ²²¹. L'association du DD de Fas, FADD et pro-caspase-8/10 forme le complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*; Figure 17) ²²². L'agrégation des procaspases initiatrices au niveau du DISC permet leur transactivation en caspases 8/10 effectrices par clivage protéolytique ²²³. Dans les lymphocytes T les caspases initiatrices 8/10 activent, par clivage, directement les caspases effectrices 3 ou 7 qui induisent alors l'apoptose par clivage protéolytique de nombreux substrats cellulaires dont les lamines responsables de la structure de l'enveloppe nucléaire ²²⁴ (Figure 17). De plus, elles activent la DNase CAD (*Caspase Activated Deoxyribonuclease*) grâce à la dégradation de son inhibiteur ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease*) ²²⁵. Étant également une protéine chaperon, l'inhibiteur ICAD est responsable du bon repliement de l'ADNase CAD dans le cytosol. La déficience en ICAD entraîne également celle de la DNase CAD par défaut de repliement et dégradation par le protéasome ²⁴². Dans les cellules autres que les lymphocytes T comme les hépatocytes (cellule dite de type 2), la quantité de caspases 8/10 activée semble insuffisante pour activer les caspases effectrices et nécessite une boucle d'amplification par la voie mitochondriale ²²⁶. Ainsi, la caspase 8 activée clive la protéine pro-apoptotique Bid en tBid qui, comme Bim, inhibe la molécule Bcl-2 et permet à Bax et Bak de former un pore à la membrane mitochondriale induisant une libération de cytochrome c ^{226,227}. Celui-ci en se liant à l'adaptateur Apaf-1 induit son changement de conformation et le recrutement de la procaspase 9 par interaction homologue de leur domaine CARD ²²⁸. L'ensemble APAF-1/cytochrome c/pro-caspase 9 constitue l'apoptosome dont la fonction est d'activer la procaspase 9 initiatrice. Cette dernière active alors, par clivage protéolytique, les caspases effectrices 3/6/7 ²²⁹. L'activation de la voie Fas/FasL est régulée négativement par la molécule FLIP (*FLICE-Like Inhibitor Protein*) qui possède un domaine DED lui permettant de se lier à FADD empêchant ainsi le recrutement des procaspases 8 et 10 dans le DISC ²³⁰. FLIP étant dépourvu de domaine caspase, sa présence au niveau du DISC empêche la transactivation des procaspases.

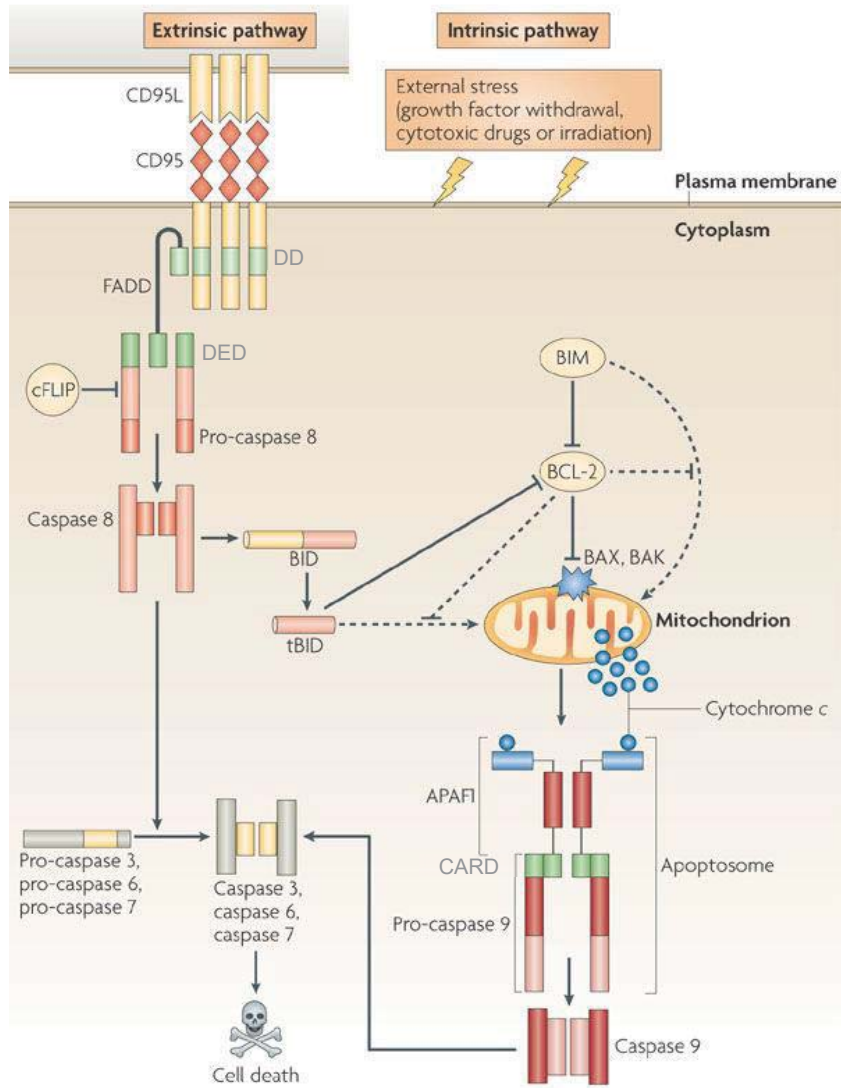


Figure 17: Mort cellulaire par les voies extrinsèque et intrinsèque

Voie extrinsèque. L'activation du récepteur CD95/Fas par son ligand CD95L/FasL induit la formation du complexe DISC constitué du DD de Fas, de la molécule adaptatrice FADD et des pro-caspases 8 et/ou 10. La formation du DISC assure l'activation des pro-caspases 8/10 en caspases 8/10 fonctionnelles qui peuvent soit directement activer les caspases effectrices 3/6/7 soit cliver Bid et induire la mort cellulaire par la voie intrinsèque mitochondriale.

Voie intrinsèque. L'expression et l'activation de Bim sont induites par de nombreux signaux extracellulaires comme une restriction en facteurs de croissance, l'irradiation ou par des voies de signalisation comme celle conduisant au facteur de transcription E2F1. Bim activé induit la formation par les molécules Bax et Bak de pores au niveau de la membrane mitochondriale permettant la libération du cytochrome c, la formation de l'apoptosome (cytochrome c, APAF1, pro-caspase 9) et donc l'activation de la caspase initiateur 9. Cette dernière active ensuite les caspases effectrices 3/6/7.

Les caspases 3/6/7 activées par la voie intrinsèque ou extrinsèque induisent l'apoptose par clivage protéolytique de nombreux composants cellulaires.¹⁷

La déficience en récepteurs Fas induit un syndrome lymphoprolifératif comme chez les souris *lpr* (paragraphe .V.1 ci-dessous, page 62, Figure 28) ou les patients atteints du syndrome ALPS (*Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*). La déficience en ligand FasL chez les souris *gld* (*Generalized Lymphoproliferation*) engendre les mêmes dérégulations de l'homéostasie des lymphocytes T que la mutation *lpr* avec accumulation dans les organes lymphoïdes secondaire de lymphocytes T matures de phénotype TCR $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-B220^+$ ²³¹ (paragraphe .V.2, page 63).

.III.3 Élimination des lymphocytes apoptotiques par les macrophages

Les cellules apoptotiques, d'origine immunitaire ou non, doivent être rapidement éliminées des tissus afin d'éviter le prolongement ou l'induction d'une réponse inflammatoire. Une élimination non efficace des cellules apoptotiques ou de leurs débris peut provoquer des réponses inflammatoires chroniques et rompre la tolérance aux antigènes du soi²³². La reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques requièrent la reconnaissance par les macrophages de différents ligands, récepteurs et molécules des cellules à phagocyter (Figure 18). Ainsi, les cellules apoptotiques libèrent des molécules chimio-attractantes pour les macrophages et les cellules dendritiques appelées signaux « *find-me* » dont la protéine ribosomale S19 et les nucléotides ATP et UTP ainsi que des lipides tels que la S1P et la lysophosphatidylcholine (LPC)^{233,234}. Les corps apoptotiques présentent également à leur surface des signaux « *eat-me* » constitués principalement des phospholipides phosphatidylsérines (PS) qui sont reconnues, après leur externalisation à la couche lipidique externe de la membrane plasmique, par des récepteurs spécifiques (Figure 18). De façon intéressante, les cellules apoptotiques peuvent sécréter également des signaux « *keep-out* » comme la lactoferrine qui inhibe le recrutement des neutrophiles mais pas des macrophages ou la protéine SIRP- α qui inhibe la phagocytose. La déficience en SIRP- α entraîne une perte de spécificité des macrophages pour les cellules apoptotiques qui peuvent alors phagocyter également les cellules non apoptotiques avoisinantes^{235,236}. La reconnaissance des PS (signal « *eat-me* ») par les récepteurs *scavenger* et les récepteurs à la PS initie la phagocytose²³². D'autres récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des corps apoptotiques dont les tyrosine-kinases Tyro-3, Axl et Mertk (appelés conjointement TAM) mais leur action requière la présence de cofacteurs²³⁷. Par exemple, les souris déficientes en récepteurs Mertk développent des syndromes auto-immuns²³⁸ (Tableau 4). La famille des récepteurs TAM n'est pas seulement impliquée dans l'élimination des corps apoptotiques mais aussi dans la régulation négative de l'activation des macrophages et des DC en inhibant leurs TLR et donc une réponse inflammatoire²³⁹. Les molécules de costimulation de la famille TIM (Figure 8) semblent également être impliquées dans l'élimination des corps apoptotiques. Ainsi, TIM1, TIM3 et TIM4 sont impliqués dans la reconnaissance des PS par les macrophages et leur déficience induit le développement d'auto-anticorps anti-ADN double brins (ADNdb) ou natif caractéristique du lupus^{222 240,241}.

La dégradation de la chromatine des cellules apoptotiques qui a été initiée par la DNase CAD (paragraphe .III, Pages 43) se poursuit dans les lysosomes des macrophages par la DNase II. La déficience en DNase II est responsable de l'accumulation de fragments d'ADN dans les phagolysosomes à l'origine de l'activation du macrophage et de la sécrétion de cytokines proinflammatoires²⁴². Cette réponse

inflammatoire est amplifiée en cas de double déficience en DNase II et ICAD qui est responsable chez la souris d'une forte activation des cellules de l'immunité innée et d'anomalies du développement thymique ²⁴³ (Tableau 4).

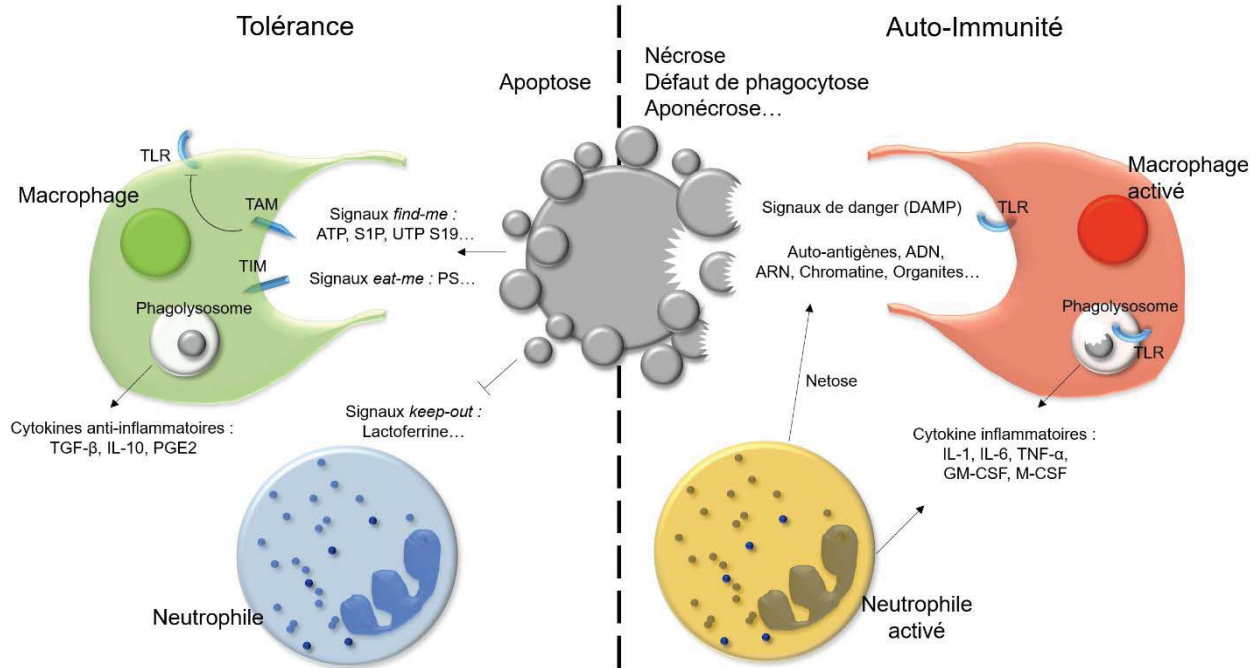


Figure 18: Rôle de la phagocytose des corps apoptotiques dans le maintien de la tolérance

.IV Récepteur P2X7

L'Adénosine 5'-triphosphate (ATP), en plus d'être la réserve énergétique majeure de la cellule, est une molécule de signalisation cellulaire impliquée dans des fonctions physiologiques aussi variées que la transmission synaptique, la sensation de la douleur ou l'inflammation. L'ATP est d'ailleurs considéré comme un signal de danger indiquant aux cellules du système immunitaire que des tissus sont agressés. La concentration en ATP est très élevée dans le milieu intracellulaire (3 à 10 mM) et maintenue à un niveau très faible dans le milieu extracellulaire (400 à 700 nM) par des ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolases également appelées apyrases ²⁴⁴. L'ATP extracellulaire peut avoir pour origine : - la lyse des cellules dans les foyers inflammatoires, - le stress mécanique (non lié à la lyse des cellules) comme le flux sanguin ou l'activité musculaire, - l'hypoxie, - l'activation cellulaire. L'importance de la signalisation purinergique pour la réponse immunitaire a d'abord été mise en évidence dans l'immunité innée. Ainsi il a été montré que c'est un activateur de l'inflammasome Nalp3 impliqué dans la maturation des cytokines proinflammatoires IL-1 β et IL-18 ²⁴⁵. En revanche, le rôle de l'ATP dans la réponse immunitaire adaptative est beaucoup moins bien compris.

.IV.1 Les récepteurs purinergiques

Les nucléotides exercent leurs effets autocrines et paracrines en activant deux grands groupes de récepteurs membranaires : les récepteurs P1 et P2. Les récepteurs P1 sont des récepteurs d'adénosines couplés aux protéines G (RCPG) qui existent sous quatre formes différentes : A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ avec des distributions tissulaires différentes. Le type de voies de signalisation qu'ils activent est fonction de la sous-unité α (i, q ou s) des protéines G auxquelles ils sont associés ²⁴⁶. Les récepteurs P2 sont classés en deux grandes familles : P2X et P2Y. Les récepteurs P2Y sont également couplés aux protéines G (Figure 19). Ils existent sous 8 formes différentes (P2Y₁, 2, 4, 6, 11, 12, 13, et 14) qui ont comme ligands différentes purines et pyrimidines. Les récepteurs P2X (P2XR) sont des récepteurs canaux existants sous 7 formes différentes (P2X₁ à P2X₇) et forment des canaux cationiques en présence de leur ligand l'ATP.

.IV.2 Récepteurs P2X

.IV.2.a Structure des P2XR

Sept gènes des P2XR (*P2RX1* à 7) ont été identifiés et clonés. Ils sont exprimés à la membrane plasmique sous forme de trimères. Chaque sous-unité de P2XR a une taille qui varie entre 379 et 595 acides aminés (aa). Les séquences peptidiques des différents P2XR présentent un taux d'homologie variant de 26 à 50 % ²⁴⁷, la partie C-terminale étant la moins conservée (Figure 21). Bien que la longueur des gènes codant pour les P2XR soit très variable (12 à 40 kb), et qu'ils possèdent des localisations chromosomiques différentes, les séquences chromosomiques sont organisées de façon similaire avec un nombre d'exons compris entre 11 et 13. Enfin, plusieurs variants d'épissage et de nombreux SNP ont été décrits pour plusieurs P2XR ²⁴⁸. Chaque sous-unité d'un P2XR est composée de deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 ainsi que d'une grande boucle extracellulaire d'environ 280 aa, ce qui n'est pas commun aux récepteurs ioniques (Figure 19). En se basant sur les séquences peptidiques de la boucle extracellulaire, qui contient, selon le sous-type, de deux à six sites de N-glycosylation et un nombre variable de ponts disulfures (10 résidus cystéines conservés) responsables de la forme générale de la boucle. Celle-ci contient également une région conservée appelée H5 formant une poche hydrophobe qui a été décrite comme étant le site de fixation de l'ATP. De plus, la proximité de cette poche avec l'entrée du canal a conduit à penser qu'elle jouerait un rôle dans la sélectivité du canal aux cations ²³. Mais comme nous le verrons au paragraphe suivant, les données cristallographiques obtenues récemment remettent en cause ces deux hypothèses ^{22,249,250}. La partie intracellulaire d'un P2XR quant à elle contient les deux extrémités N et C terminales qui possèdent des sites consensus de fixation pour des protéines de transduction du signal ²⁵¹

(Figure 19). En plus de leur capacité à former des homotrimères, il semble que certains P2XR puissent former également des hétérotrimères dont les fonctions et propriétés pharmacologiques sont dépendantes de la composition du trimère. Cependant, la capacité à former des hétérotrimères ne semble pas s'appliquer au P2X7R même si son association avec le P2X4R a été mise en évidence *in vitro* par surexpression des deux récepteurs. La réalité physiologique de cette association est contestée car instable²⁵². La fonction des P2XR est également déterminée par un polymorphisme important et l'existence d'épissage alternatif au niveau des parties N et C terminales. Par exemple, dans le cas de P2X2 l'épissage alternatif de la partie C-terminale génère une isoforme possédant une capacité de désensibilisation plus rapide en présence d'ATP^{252,253}.

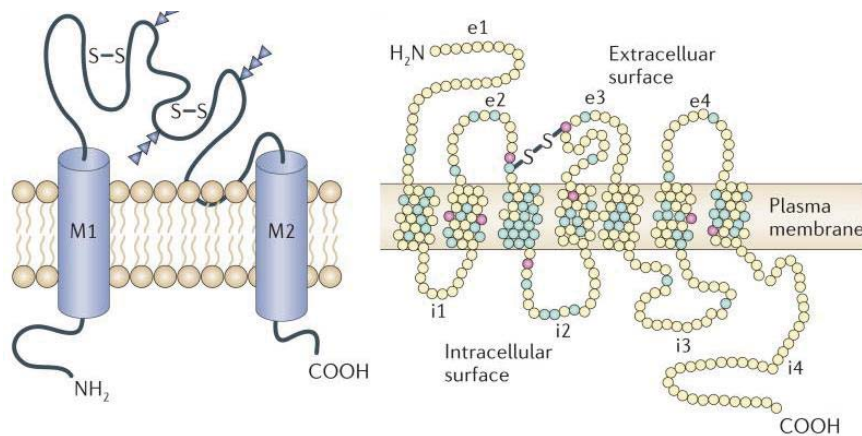


Figure 19: Représentation schématique des récepteurs à l'ATP et aux adénosines de type P2

La partie gauche de la figure représente un monomère d'un récepteur-canal P2X. Ce canal ionique dépendant de l'ATP est caractérisé par deux domaines transmembranaires M1 et M2 et une grande boucle extracellulaire dont la région hydrophobe H5 qui a été initialement décrite comme le site de fixation à l'ATP. Cette boucle est riche en résidus cystéines et en sites de N-glycosylations. La partie droite de la figure représente un récepteur P2Y constitué de sept passages transmembranaires fixant les adénosines et d'autres nucléotides (puriques ou pyrimidiques).²³

La détermination de la structure cristallographique du récepteur P2X4 du poisson zèbre a permis de mieux préciser la structure générale des P2XR^{22,250}. Ces études ont confirmé que les P2XR sont trimériques et mis en évidence que les trois monomères s'organisent en une structure dite caliciforme. Chaque monomère a la forme d'un « dauphin ». La queue du dauphin est constituée de deux hélices α qui correspondent aux domaines transmembranaires TM1 et TM2. La partie centrale de la boucle extracellulaire constitue le corps du dauphin. Elle est organisée en un sandwich de deux feuillets β riches en ponts disulfures qui assurent sa rigidité (Figure 20 A). C'est la région la plus conservée des P2XR. La boucle extracellulaire possède également des parties plus flexibles qui constituent la tête et les nageoires droite, gauche et dorsale du dauphin (Figure 20 A et C). Le site de fixation de l'ATP est situé entre la tête et la nageoire gauche de chaque dauphin. La nageoire dorsale d'une sous-unité voisine participe également à

la fixation du ligand formant ainsi une poche riche en résidus chargés positivement favorisant la fixation de la forme physiologique de l'ATP, l'ATP⁴⁻ (Figure 20 B). Cette étude cristallographique a permis de définir le mécanisme d'activation et d'ouverture du canal. Lorsque le récepteur est sous sa forme inactive, la fermeture du canal est assurée par l'assemblage croisé du domaine transmembranaire TM2 de chacune des trois sous-unités. En présence d'ATP plusieurs changements conformationnels ont lieu dont un rapprochement de la tête et de la nageoire dorsale de deux sous-unités voisines ce qui, d'une part, assure une bonne fixation de l'ATP et, d'autre part, cause la rotation du corps central sur lui-même entraînant l'écartement des domaines transmembranaires et l'ouverture du canal (Figure 20 C). La sélectivité aux cations est due à la richesse en résidus acides du vestibule central. Les mécanismes moléculaires responsables de la formation du pore non-sélectif en présence d'ATP n'ont pas pu être abordés dans cette étude car la détermination de la structure cristallographique du récepteur P2X4 a été réalisée en absence des parties C-terminales qui sont indispensables à la formation du pore (voir : Fonctions cellulaires de P2X7R page 56).

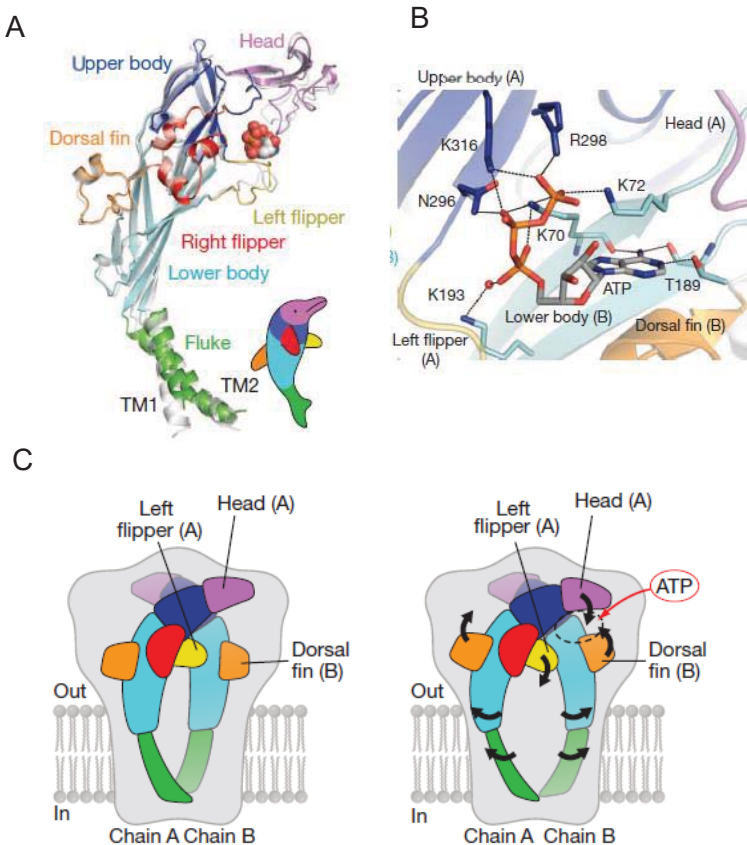


Figure 20: Structure cristallographique du récepteur P2X4 du poisson zèbre

A) chacun des trois monomères du récepteur-canal P2X4 présente une structure en forme de dauphin. A chaque domaine du récepteur correspond une partie du corps du dauphin. Cette représentation est une superposition du monomère en présence (en couleur) et en absence (en gris) d'ATP. B) agrandissement du site de fixation de l'ATP formé par le rapprochement de la tête et de la nageoire gauche du dauphin représentant le monomère nommé (A) et la nageoire dorsale du dauphin représentant le monomère (B). C) Modèle du mécanisme d'ouverture du canal P2X en réponse à la fixation de l'ATP. Les flèches sur la figure de droite montrent les changements conformationnels associés à la fixation de l'ATP. ²²

.IV.2.b Fonctions des récepteurs P2X

L'ATP⁴⁻ est le ligand naturel des récepteurs-canaux P2X. Toutefois, dans les lymphocytes T de souris (mais pas les macrophages), P2X7R peut être activé suite au transfert covalent d'un groupement ADP-ribose sur certains résidus du récepteur à partir du NAD extracellulaire grâce à l'enzyme mono ADP-ribosyl transférase-2.2 (ART2.2). Le NAD est normalement présent dans le sérum à des concentrations faibles (< 0,1 µM) mais peut être libéré en grande quantité par les cellules lésées d'un site inflammatoire ²⁵⁴. Cependant, ce mécanisme d'ADP ribosylation de P2X7R n'a pas encore été décrit chez l'Homme. Une brève activation des récepteurs P2X par l'ATP induit la formation d'un canal cationique non sélectif permettant un influx de Ca²⁺ et Na⁺ et un efflux de K⁺ massifs causant une dépolarisation de la membrane plasmique et l'activation subséquente de canaux calciques voltage dépendant accentuant alors l'influx de Ca²⁺ ²⁵⁵. D'autre part, dans le cas du P2X7R, une exposition plus longue à l'ATP peut induire la formation d'un pore non-sélectif permettant le passage de molécules dont la taille varie de 400 à 900 Da selon le type cellulaire ²⁵⁶.

.IV.2.c Sensibilité des P2XR à leur ligand

La sensibilité (affinité et désensibilisation) à l'ATP diffère grandement d'un récepteur P2X à l'autre ce qui amène à les classer en trois groupes : 1) un groupe constitué par les récepteurs possédant une très forte affinité pour l'ATP comme P2X1, 3, 5 et 6 qui sont activés par de très faibles concentrations de ligand (EC₅₀ = 0,5-3 µM) ; 2) un groupe contenant les récepteurs P2X2 et P2X4 dont la sensibilité à l'ATP est moindre avec un EC₅₀ = 10 µM ; 3) le groupe contenant P2X7R et dont l'affinité pour l'ATP est faible. Cette troisième catégorie de P2XR requière des concentrations très élevées en ATP (100 à 500 µM selon le type cellulaire) pour s'activer ²⁵⁷. L'exposition des P2XR à l'ATP induit leur désensibilisation plus ou moins rapide selon le type de récepteur. Ainsi les P2X1R et P2X3R se désensibilisent très rapidement alors qu'à l'inverse le P2X7R n'est pas ou peu désensibilisé même après une exposition de plusieurs minutes à l'ATP ²⁴⁸ (Tableau 3). La sensibilité à l'ATP des hétérotrimères est difficile à définir à cause de la variabilité des propriétés pharmacologiques des différentes sous-unités les constituant ce qui leurs confèrent ainsi des propriétés intermédiaires.

.IV.2.d Distribution tissulaire des récepteurs P2X

Les P2XR sont exprimés par la plupart des tissus dont les neurones, les cellules gliales, les hépatocytes, les cellules osseuses, les cellules hématopoïétiques ou encore les cellules endothéliales. Ils

sont impliqués dans la transmission synaptique et la libération de neurotransmetteurs ²⁵⁸, la régénération hépatique et dans la réponse immunitaire notamment grâce à P2X7R qui est exprimé à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques (lymphocyte, mastocyte, monocyte/macrophage...) ²⁵⁹ (Tableau 3).

Tableau 3 : Distribution tissulaire et sensibilité in vitro à l'ATP des récepteurs P2X

Récepteurs	ATP EC50 (µM)	Désensibilisation	Expression tissulaire
P2X1	1	~ 300 millisecondes	muscle lisse, plaquettes, cervelet, neurones de la moelle épinière
P2X2	10	1 à 2 secondes	muscle lisse, SNC, rétine, pancréas
P2X3	3	< 100 millisecondes	neurones sensorielles, système nerveux sympathique
P2X4	7	5 à 10 secondes	SNC, testicules, colon, cellules endothéliales, microglie, foie, macrophage
P2X5	0,5	~ 5 secondes	épiderme, intestin, vessie, thymus, moelle épinière, cœur
P2X6	Absence de canaux homotrimeriques		SNC, neurones moteurs de la moelle épinière
P2X7	> 100	absente	système immunitaire, pancréas, peau, SNC, foie

D'après Kakh *et al*, 2001 ²⁶⁰; North *et al*, 2002²⁴⁸ et Fields *et al*, 2006 ²³

.IV.3 Structure et fonctions du récepteur P2X7

Chez l'Homme, P2X7R est une protéine de 595 aa codée par un gène contenant 13 exons situé sur le chromosome 12 (chromosome 5 chez la souris). L'extrémité C-terminale de P2X7R est plus longue que celle des autres P2XR lui permettant ainsi d'être impliquée dans de nombreuses voies de signalisation grâce à sa capacité à interagir avec des protéines du cytosquelette, la phosphatidylinositol-1-4-kinase, des protéines de choc thermique (HSP 70 et 90 et HSC 71), des récepteurs à activité tyrosine kinase (Membrane associated Guanylate kinase p55 MAGuk), des phosphatases de type RPTP-β (Receptor Tyrosine Phosphatases) ²⁶¹ ou encore la calmoduline ²⁶². Cette extrémité est également impliquée dans la translocation des récepteurs à la membrane cytoplasmique grâce à la palmitoylation de plusieurs de ses cystéines ^{263,264} ainsi que dans la régulation de la fonction canal et probablement dans la transformation du canal en pore ^{265,266} (Figure 21).

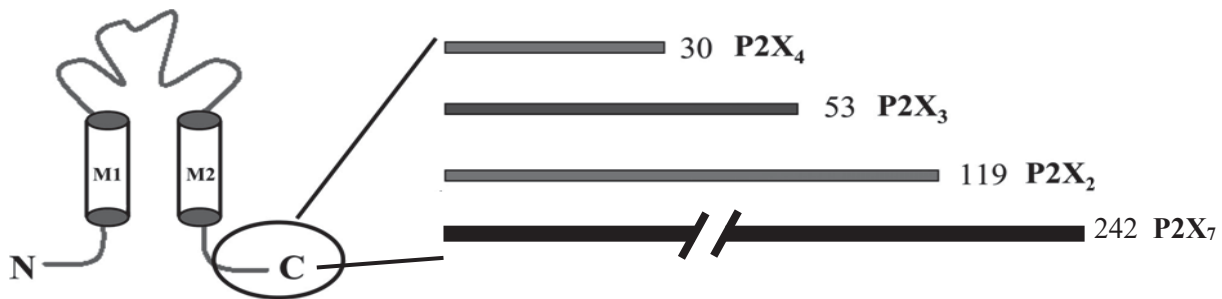


Figure 21: Grande variabilité de taille de la queue C-terminale des récepteurs P2X

.IV.3.a Fonctions cellulaires de P2X7R

La durée de stimulation du P2X7R par l'ATP détermine la nature de l'activité cellulaire induite. Une brève activation du P2X7R par de fortes concentrations d'ATP ($> 100 \mu\text{M}$) ouvre un canal cationique permettant un influx Ca^{2+} et de Na^+ et un efflux de K^+ (Figure 22) ainsi que l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS). Cette externalisation des PS n'est pas liée à l'apoptose des cellules puisque réversible si l'ATP est éliminée ²⁶⁷. Une stimulation plus longue par l'ATP conduit à l'ouverture d'un pore non sélectif qui laisse passer des molécules de masse moléculaire pouvant atteindre 900 Da. Cependant la taille du pore varie selon le type cellulaire, ainsi, dans les lymphocytes T, il ne laisse passer que des molécules de taille inférieure à 650 Da ²⁶⁸. Le mécanisme d'ouverture du pore non sélectif dépendant de P2X7R est encore débattu. Initialement, il a été considéré que le pore se forme suite à l'élargissement du canal P2X7 ²⁶⁹. L'implication de la pannexine-1 (Pann1) dans la formation de ce pore a été ensuite proposée par le même groupe ²⁷⁰. Cependant, d'autres chercheurs ont mis en évidence la formation du pore P2X7R chez des souris déficientes pour la Pann1 ²⁷¹. Il a également été montré que la formation du pore P2X7R nécessite l'activation de la protéine anoctamine 6 ²⁷². Plus récemment, il a été mis en évidence la formation de pores non sélectifs dans des liposomes n'exprimant que des récepteurs P2X7R ce qui exclue l'intervention de protéines supplémentaires comme la pannexine-1 ou l'anoctamine 6 ²⁷³.

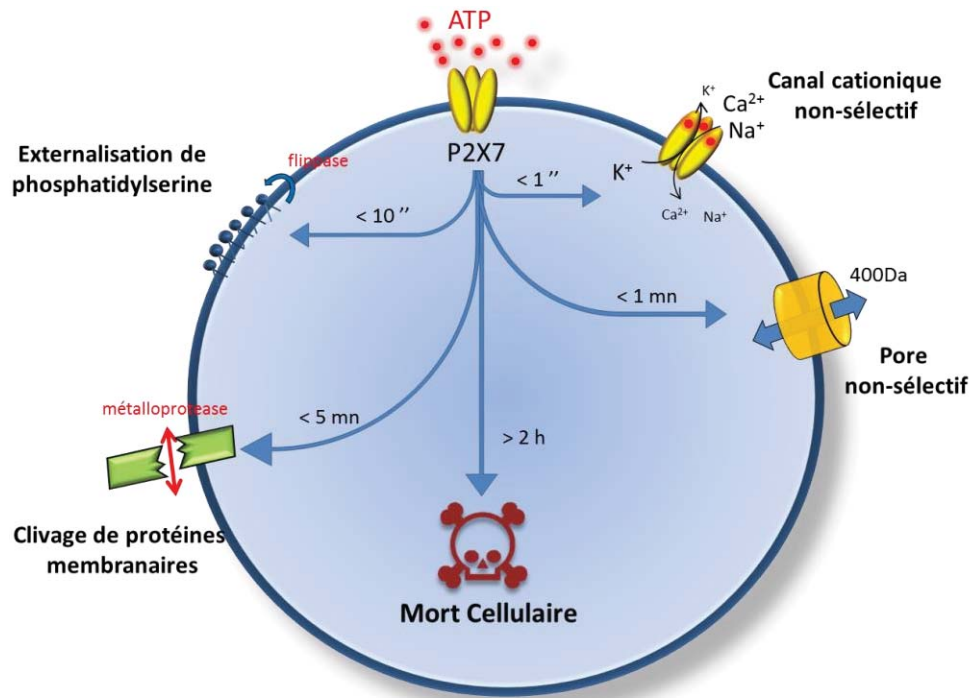


Figure 22: Activités cellulaires induites par l'activation du P2X7R

Schéma illustrant les 5 types de réponses cellulaires mesurées « en routine » au laboratoire pour évaluer la sensibilité des lymphocytes T à l'ATP. Les temps indiqués pour l'ouverture du canal, l'externalisation des PS et la formation du pore non-sélectif correspondent au temps physiologique décrit dans la littérature et non pas au temps expérimentaux utilisés au laboratoire (Safya et al⁷, Mellouk et al, pages 79 et 97 et paragraphe .I.2, page 178).

La stimulation par l'ATP induit également l'activation par P2X7R des protéases de membrane ADAM10 et 17 responsables du clivage de protéines membranaires comme la L-sélectine (CD62L)^{24,274}, le récepteur de basse affinité pour les IgE (CD23) ou encore le précurseur de la protéine amyloïde (APP : *Amyloid Precursor Protein*)^{267,275,276}. Enfin, une longue stimulation par l'ATP (2 à 4 heures) induit la formation de « *blebs* » à la membrane plasmique et la mort des cellules par apoptose ou par aponécrose selon le type cellulaire²⁷⁷⁻²⁷⁹ (Figure 22). Dans les macrophages, il a été montré que la boucle extracellulaire de P2X7R interagit avec les corps apoptotiques et assure leur élimination. P2X7R serait donc également un récepteur scavenger impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Il a également été suggéré que cette boucle interagit avec la matrice extracellulaire²⁸⁰.

.IV.3.b Isoformes du récepteur P2X7

Chez l'Homme, en plus de la forme classique P2X7a, neuf isoformes (b à j) ont été découvertes à ce jour. Sept de ces isoformes (P2X7a-h) sont issues d'épissages alternatifs générant la perte et/ou l'acquisition d'exons à partir des introns du gène²⁸¹ (Figure 23). Les deux isoformes g et h présentent un exon additionnel, N3, entre les exons 2 et 3 aboutissant à la création d'un nouveau codon d'initiation de la traduction et la production d'une protéine P2X7 déficiente pour le premier domaine transmembranaire TM1. Les isoformes P2X7c à P2X7f sont déficientes pour différents exons codant certaines parties du domaine extracellulaire d'interaction avec le ligand. Dans le cas des trois isoformes b, c et e, un intron supplémentaire est inséré entre les exons 10 et 11 générant un codon stop prématuré et par conséquent la traduction d'une protéine déficiente pour la partie C-terminale.

Plusieurs études ont comparé la fonctionnalité de ces nouvelles isoformes avec la forme classique P2X7a¹². Par exemple, P2X7b, qui a perdu la partie C-terminale est très peu fonctionnel. En revanche, lorsqu'il est coexprimé avec l'isoforme P2X7a, le taux de formation des canaux, et donc l'influx de Ca²⁺, est considérablement augmenté. Il en est de même pour la formation de pores non-sélectifs ou la formation des « *blebs* » associée à la mort cellulaire²⁶⁶. Enfin, les deux isoformes P2X7i et P2X7j sont non fonctionnelles car issues de mutations ponctuelles générant des protéines tronquées. Le variant P2X7j présente ainsi une délétion totale de la partie C-terminale et du deuxième domaine transmembranaire TM2. Il a été découvert dans des cellules de cancer de l'utérus où il agit comme un dominant négatif inhibant la signalisation par l'ATP et bloquant par conséquent la mort cellulaire^{282,283}. Chez la souris deux isoformes, P2X7a et P2X7k, ont pour l'instant été identifiées. Elles diffèrent quant à leur expression tissulaire et leur sensibilité à l'ATP²⁸⁴. La découverte de l'isoforme P2X7k a été rendue possible grâce à la production, en

parallèle, de deux lignées de souris invalidées pour le P2X7R (souris P2X7KO). Dans la première lignée de souris P2X7KO produite par le groupe GlaxoSmithKline® (GSK), le gène *P2X7* a été inactivé par l'insertion du gène Lac Z dans l'exon 1 alors que dans celle réalisée par le groupe Pfizer®, une cassette Néomycine a été insérée dans l'exon 13 du gène *P2X7*. Il a été observé de façon totalement inattendue que les lymphocytes T des souris P2X7KO du groupe GSK®, mais pas leurs neurones, expriment un P2X7R fonctionnel. Chez cette souris KO, un variant de P2X7R (dénommé P2X7k) utilise un exon 1' alternatif à l'exon 1. Cet exon code pour la partie N-terminale et une petite partie du premier domaine transmembranaire TM1. L'ARNm de l'isoforme P2X7k est exprimée fortement dans le foie et la rate. L'isoforme alternative P2X7k présente une sensibilité huit fois plus grande à l'ATP que l'isoforme classique P2X7a ainsi qu'une désactivation plus lente. L'isoforme P2X7k forme également beaucoup plus rapidement le pore non-sélectif. Enfin, la cinétique de formation de « blebs » apoptotiques est plus rapide avec l'isoforme P2X7k qu'avec P2X7a ce qui semble qualifier l'isoforme P2X7k comme récepteur de mort²⁸⁴⁻²⁸⁶.

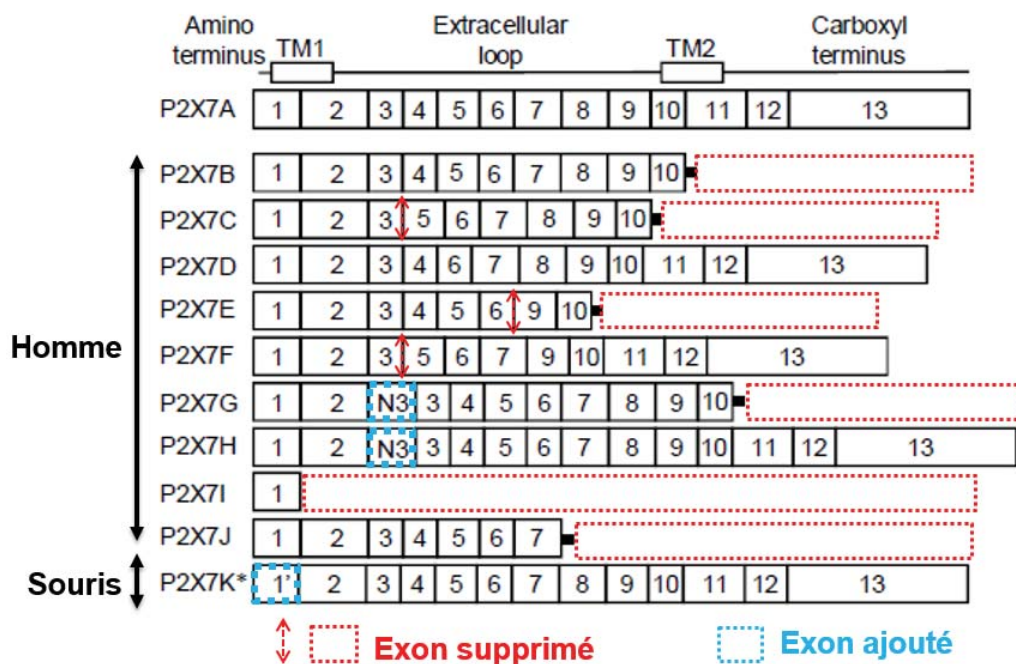


Figure 23: Isoformes connues de P2X7

La partie haute du schéma représente les différents domaines du P2X7R humain : boucle extracellulaire, domaines transmembranaires TM1 et TM2, extrémités N et C terminales. À chaque domaine de la protéine correspond un ou plusieurs des 13 exons de l'isoforme P2X7a qui est considéré comme la forme classique du P2X7R. Le reste de la figure montre la structure en exons de l'ensemble des isoformes décrites à ce jour. *P2X7k est la seule isoforme alternative à P2X7a décrite à ce jour chez la souris. Adapté d'après Sluyter et al, 2011.¹²

.IV.3.c Récepteur P2X7 et système immunitaire

.IV.3.c.1 Maturation et sécrétion des cytokines

Le P2X7R joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire inflammatoire. L'ATP libéré dans le foyer inflammatoire est ainsi impliquée dans la maturation et/ou la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-18 et le TNF α) par les cellules de l'immunité innée. Il est à noter que les cytokines IL-1 et IL-18 sont dépourvues du peptide signal responsable de la sécrétion par la voie classique. Elles sont d'abord produites sous forme de pro-IL-1 β et pro-IL-18 par les macrophages suite à l'activation de leurs TLR (*Toll-Like Receptor*) par des antigènes (Figure 24). Leur maturation en IL-1 β ou en IL-18 est dépendante de la caspase-1. Cette dernière est elle-même présente dans les macrophages sous forme inactive (pro-caspase-1). L'activation protéolytique de la pro-caspase-1 est dépendante d'une structure multimérique spécialisée nommée « *IL-1 inflammasome protein complex* »²⁸⁷. P2X7R joue un rôle central dans l'activation de ce complexe. Ainsi, l'activation du P2X7R des macrophages par l'ATP induit la formation d'un canal responsable d'un efflux de K⁺ qui constitue le signal d'activation de la protéine NALP3 (ou NLRP3). Cette activation induit son changement conformationnel suivi de son oligomérisation. NALP3 activé peut alors recruter la protéine adaptatrice ASC qui associée à la pro-caspase-1 forme l'inflammasome. Ce dernier active la pro-caspase-1 en caspase-1 qui peut alors cliver la pro-IL-1 β et/ou la pro-IL-18 en IL-1 β et/ou IL-18. Le P2X7R participe également à la sécrétion de l'IL-1 β en activant la phospholipase A2 calcium-dépendante (cPLA2) et la phosphatidylcholine-spécific phospholipase C (PC-PLC) qui sont à l'origine de l'exocytose de lysosomes contenant l'IL-1 β (Figure 24)^{288,289}.

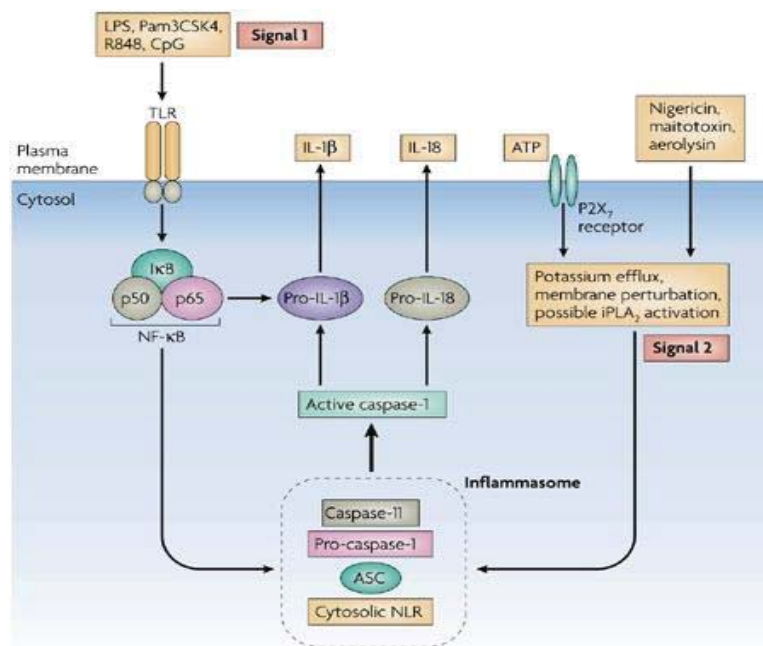


Figure 24 : Rôle de P2X7R dans la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 par les cellules de l'immunité innée

Deux signaux extracellulaires distincts sont nécessaires à la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 dans les macrophages. Le premier signal est la stimulation des TLR par un ligand spécifique comme le LPS (lipopolysaccharide). Cette stimulation induit la synthèse des pro-IL-1 β , pro-IL-18 et certains constituants de l'inflammasome comme la caspase-11 chez la souris. La caspase-1 active est responsable de la maturation et de la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18. Son activation dépend de celle de l'inflammasome qui est assurée par un efflux de potassium induit lors de l'ouverture du canal P2X7R. L'efflux potassique peut être induit par d'autres voies.¹⁴

La sécrétion du TNF- α par les macrophages résulte du clivage de sa forme membranaire par la protéase TACE (*TNF- α Converting Enzyme*) / ADAM17 auquel P2X7R participe. Ainsi, la stimulation des macrophages par l'ATP est responsable de l'activation d'ADAM17 mais aussi de l'augmentation de son taux d'expression à la surface cellulaire. La stimulation de P2X7R induirait une amplification de l'expression d'ADAM17 dans les exosomes et leur adressage à la membrane plasmique à travers une augmentation du flux calcique et l'activation de la MAPK p38 ²⁹⁰.

.IV.3.c.2 Activation et différenciation des lymphocytes T

Les preuves de l'implication de P2X7R dans les réponses immunitaires adaptatives sont de plus en plus nombreuses, en particulier, dans les événements précoces d'activation des lymphocytes T par l'antigène. Ainsi, les lymphocytes T libèrent lors de leur activation de l'ATP dans le milieu extracellulaire qui, de façon autocrine, stimule les P2X7R. L'influx de Ca²⁺ généré par la stimulation de P2X7R entraîne l'activation du facteur NFAT responsable de la transcription du gène codant l'IL-2 ²⁹¹⁻²⁹⁴ (Figure 25). Les voies de signalisation activées par le P2X7R des lymphocytes T participe également à leur différenciation. Ainsi, lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs par le TCR, il a été observé qu'une absence de signalisation par la voie P2X7R favorise leur différenciation en lymphocytes iTreg. À l'inverse, les capacités suppressives des lymphocytes Treg ainsi que la stabilité de leur phénotype sont réduites après une stimulation par l'ATP. Enfin, en contexte inflammatoire, la stimulation des lymphocytes Treg par l'IL-6 augmente leur sécrétion autocrine d'ATP qui induit leur différenciation en lymphocytes Th17 par la voie P2X7R ²⁹⁵ suggérant que le P2X7R favorise la différenciation en lymphocytes Th17 au détriment des lymphocytes iTreg ce qui pourrait, en cas de syndrome auto-immun, amplifier la pathologie puisque les lymphocytes Th17 sont également responsables de tels désordres immunitaires.

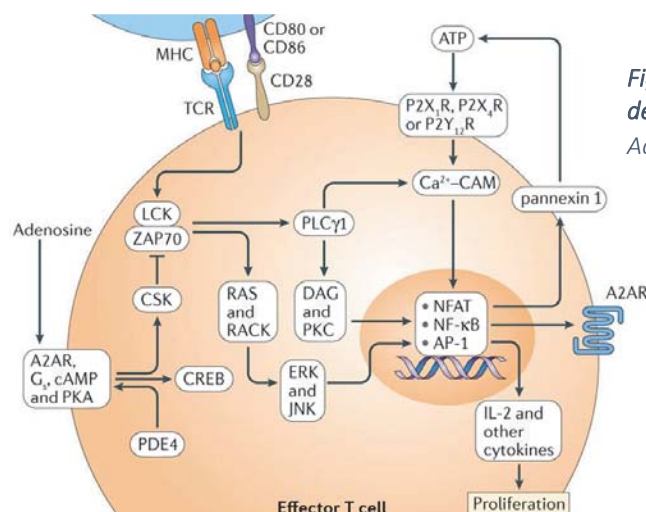


Figure 25 : Rôle de P2X7R dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T

Adapté d'après Cekic et al, 2016. ¹⁵

D'autre part, la présence d'IL-1 β (du moins chez l'homme) est requise pour la différenciation en lymphocytes Th17. Or comme nous l'avons vu précédemment l'activité canal de P2X7R est impliqué dans la maturation et la sécrétion de l'IL-1 β ^{296,297}. P2X7R participerait également à l'immunité des muqueuses en contrôlant le nombre de lymphocytes T *helper* folliculaires (Tfh) recrutés dans les plaques de Peyer et qui participent la commutation des IgM en IgA²⁹⁸.

.IV.3.c.3 Clivage de la molécule de homing L-sélectine/ CD62L

La molécule L-sélectine (ou CD62L) est une protéine d'adhérence exprimée à la membrane plasmique des leucocytes. Elle joue un rôle crucial dans les mécanismes de recirculation des lymphocytes vers les foyers inflammatoires et les différents organes lymphoïdes secondaires d'où son nom de récepteur de *homing*. Son taux d'expression à la surface des lymphocytes est régulé par des métalloprotéases de membrane de la famille ADAM qui clivent la molécule au niveau du domaine juxta-membranaire. La stimulation de P2X7R par l'ATP induit un clivage rapide de CD62L suite à l'activation d'ADAM10 et 17²⁷⁴. Le clivage de CD62L de la surface des lymphocytes T dans les foyers inflammatoires, riches en ATP, leur fait perdre la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques et à l'inverse favorise leur rétention dans le site inflammatoire pour y exercer leurs fonctions effectrices (Figure 7 et Figure 26).

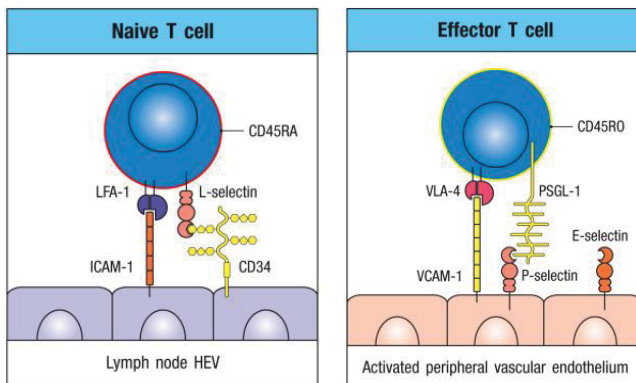


Figure 26: P2X7R dans la migration des lymphocytes T

L'activation de P2X7R par l'ATP induit le clivage protéolytique de CD62L ce qui restreint la capacité des lymphocytes T à migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et favorise leur rétention dans le foyer inflammatoire.⁸

.IV.3.c.4 Sensibilité des sous-populations lymphocytaires T à l'ATP

La sensibilité à l'ATP des différentes sous-populations de lymphocytes T varie avec leur phénotype et leur état d'activation. Il est généralement considéré que les lymphocytes T CD8⁺ de la rate, des ganglions lymphatiques et du foie expriment un taux faible de P2X7R et sont peu sensibles à l'ATP comparés aux lymphocytes T CD4⁺ alors que ceux de l'épithélium intestinal sont très sensibles à l'ATP et expriment des taux élevés de P2X7R²⁹⁹. Cependant, comme nous le verrons dans notre article intitulé « *CD8+ but not CD4+ effector/memory T cells express the CD44^{high}CD45RB^{high} phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses* » (page 97) la nature de cette

différence de sensibilité à l'ATP entre lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est complexe. La sensibilité des lymphocytes Treg CD4⁺ est également controversée. Pour certains auteurs, les lymphocytes Treg sont beaucoup plus sensibles à l'activation du P2X7R que les lymphocytes Tconv CD4⁺ ce que semble confirmer leur taux élevé en ARNm codant P2X7R. Pour d'autres auteurs, la sensibilité des Treg à l'ATP est identique à celle des lymphocytes Tconv CD4⁺ ^{300,301} qui dépendrait du taux d'expression membranaire en molécules tyrosines phosphatases CD45RB ^{267,302} dont la famille (CD45) joue un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire, en particulier, dans l'activation des lymphocytes par leurs récepteurs d'antigène ou la régulation négative de la signalisation par les récepteurs aux cytokines ³⁰³. Dans l'article de Safya *et al* (page 79), l'étude de l'ensemble des fonctions cellulaires induites par la voie ATP/P2X7R dans les lymphocytes Treg et Tconv, à leurs différents stade d'activation et de différenciation, nous a permis de préciser l'origine des différences de sensibilité à l'ATP observées entre ces deux sous-populations.

.V Lymphocytes T et lupus

.V.1 Souris MRL/lpr

Les souris MRL/lpr sont homozygotes pour la mutation *lpr* (*lymphoproliferation*) du récepteur d'apoptose Fas normalement responsable de l'élimination des lymphocytes T en fin de réponse immunitaire. Ces souris présentent une hyperplasie de la rate et des ganglions lymphatiques due à une accumulation de lymphocytes T effecteurs, de phénotype inhabituel (TCR αβ⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺), incapables de mourir par apoptose (Figure 27). Elles développent également spontanément différentes pathologies auto-immunes dont le lupus érythémateux disséminé (LED), le syndrome de Sjögren et la polyarthrite rhumatoïde. Comme chez les patients atteints de LED, les souris MRL/lpr développent spontanément des atteintes dermatologiques, vasculaires, rénales, pulmonaires, oculaires et articulaires sévères dues à des infiltrations lymphoïdes ainsi que des titres élevés en auto-anticorps anti-ADNdb et en facteur rhumatoïde (Figure 27). Ces auto-anticorps sont responsables de glomérulonéphrites qui entraînent la mort des souris MRL/lpr à l'âge de 4 ou 5 mois. La sévérité de la maladie est également liée aux taux sériques élevés de cytokines proinflammatoires, de FasL soluble ainsi que de cytokines de type Th1, Th2 et Th17. Il est important de noter que la mutation *lpr* est « *leaky* » et que 10% de récepteurs Fas fonctionnels sont présents à la surface des cellules. Or notre laboratoire a montré que le défaut d'expression de Fas entraîne une surexpression de son ligand, FasL, à la surface des lymphocytes T et B activés ce qui les rend fortement cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de cellules exprimant Fas ³⁰⁴⁻³⁰⁸. Une autre caractéristique qui est unique à ce modèle est la rapidité avec laquelle les syndromes auto-immuns se développent et entraînent

la mort des animaux. En effet, la maladie commence vers l'âge de 2 mois avec une activation polyclonale des lymphocytes B et des niveaux élevés d'immunoglobulines sériques. À l'âge de 3 mois, les souris MRL/*lpr* produisent des taux élevés de différents auto-anticorps dont des anti-ADNdb et du Facteur Rhumatoïde. Puis, à partir de 4 mois, elles développent une glomérulonéphrite proliférative engendrée par des complexes immuns, une inflammation vasculaire, une arthrite et une lymphadénopathie massive qui engendre des problèmes rénaux et la mort des femelles MRL/*lpr* en moyenne à l'âge de 17 semaines et des mâles à l'âge de 22 semaines. Cependant, comme l'ont montré plusieurs équipes dont la nôtre (³⁰⁹ et Mellouk et al, *manuscrit soumis*), l'inactivation du récepteur Fas ne peut rendre compte à elle seule de l'ensemble des pathologies des souris MRL/*lpr*. En effet, comparé aux souris MRL/*lpr*, les souris C57BL/6 déficientes en récepteur d'apoptose Fas (B6/*lpr*) développent une faible lymphoprolifération et peu ou pas de syndromes auto-immuns ce qui indique, qu'en plus de la mutation *lpr*, d'autres *loci* sont impliqués dans la maladie. Le récepteur purinergique P2X7 pourrait être un de ces *loci*.

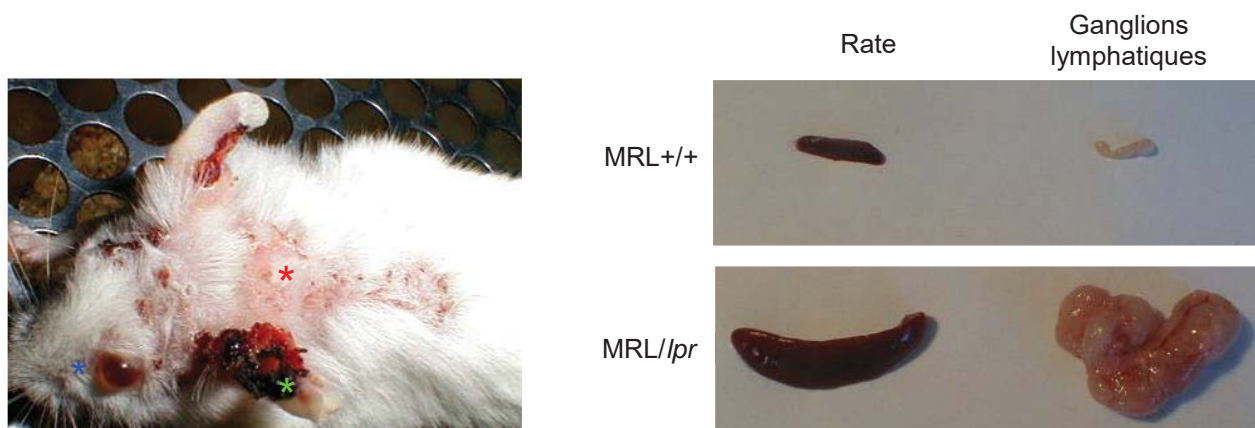


Figure 27 : Les souris MRL/*lpr*, un modèle spontané d'auto-immunité

À gauche : * lésions inflammatoires du tissu cutané du cou, * vascularites cutanées nécrosantes des oreilles, * inflammation des glandes lacrymales. À droite : splénomégalie et adénopathies dues à l'accumulation de lymphocytes T DN B220⁺. Adapté d'après Bobé et al, 2006.³

.V.2 Lymphocytes T DN B220⁺

L'accumulation massive des lymphocytes T de phénotype TCR $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-B220^+$ (DN B220⁺) est une des caractéristiques principales du syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS) chez l'Homme et la souris. Chez la souris, l'accumulation de cette sous-population est associée principalement aux mutations *lpr* et *gld* des gènes codant le récepteur Fas et son ligand FasL et n'est pas retrouvée chez les souris Bim^{-/-} ou les autres modèles de lymphoprolifération. Cela suggère qu'elle est due à un défaut d'apoptose par la voie Fas/FasL. L'origine de cette population de lymphocytes T demeure controversée.

Certaines études montrent qu'elle dérive de lymphocytes Tconv activés ayant perdu l'expression des corécepteur CD8 et CD4 alors que d'autres suggèrent qu'elles sont issues de l'amplification d'une sous-population de lymphocytes T régulateurs de phénotype TCR $\alpha\beta^+$ DN B220⁺ 310 (Figure 28). Dans les souris MRL/lpr, la proportion de lymphocytes T DN B220⁺ passe en trois mois (entre l'âge de 2 à 5 mois) de moins de 5 % à plus de 80 % des lymphocytes T périphériques. Cette forte proportion est due à l'accumulation de lymphocytes T DN B220⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires et non pas à une diminution du nombre de lymphocytes Tconv CD4⁺ ou CD8⁺. En revanche, l'homéostasie des lymphocytes T n'est pas affectée dans le thymus et les épithéliums 315.

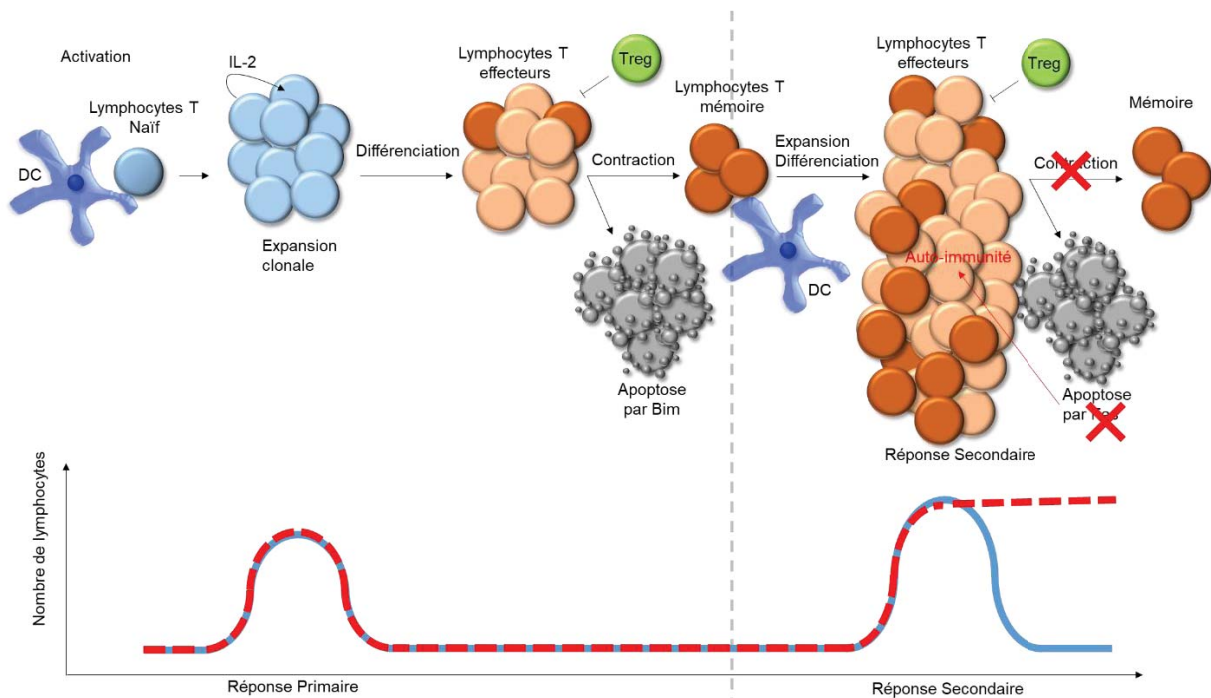


Figure 28 : Perte de l'homéostasie des lymphocytes T en réponse secondaire lors de déficience en Fas ou FasL

Ligne bleue et rouge : évolution du nombre de lymphocytes T aux cours lors d'une réponse immunitaire chez un animal normal ou déficient pour la voie Fas/FasL.

Les lymphocytes T DN B220⁺ pathogéniques ont une capacité proliférative réduite, comparé aux lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺, et ne sécrètent pas d'IL-2 après activation par la voie TCR 311. De plus, elles expriment la phosphatase de membrane B220 (CD45RABC) qui est un marqueur pan B chez la souris et de certaines sous-populations lymphocytaires B matures chez l'Homme ainsi qu'un marqueur d'apoptose des lymphocytes T humains et murins 310,312-314.

.V.2.a Origine CTL des lymphocytes T DN B220⁺

L'hypométhylation du gène codant le corécepteur CD8 dans les lymphocytes T DN B220⁺ a conduit à considérer qu'ils dérivent de lymphocytes T activés ayant perdu l'expression du corécepteur CD8³¹⁶ mais cet argument n'est peut-être pas suffisant à cause de la phase DP des lymphocytes T lors de leur développement thymique³¹⁰. Cependant, il a été observé que les lymphocytes T CD8⁺ matures incapables de reconnaître en périphérie les molécules de CMH I, suite à un défaut de sélection thymique, perdent l'expression de CD8 pour devenir DN et augmentent celle de Fas et FasL entraînant leur élimination par apoptose³¹⁷. De même, une déficience en molécules $\beta 2m$ ($\beta 2$ microglobuline) du CMH I, à l'origine du non développement des lymphocytes T CD8⁺ dans le thymus, réduit drastiquement l'accumulation des lymphocytes T DN chez les souris *lpr*^{318,319}. D'autre part, les lymphocytes T DN B220⁺ expriment un taux élevé du facteur de transcription Eomes qui est responsable du développement des CTL et des NK. Enfin, la déficience en Eomes protège les souris *lpr* du développement d'adénopathies causées par l'accumulation de lymphocytes T DN B220⁺³²⁰. Le répertoire TCR des lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ présente une diversité restreinte au niveau de la chaîne V β qui est essentiellement du même type que celle des lymphocytes T CD8⁺³²¹. De plus, leur survie *in vivo* dépend de la présence d'IL-15 impliqué principalement dans la survie des lymphocytes T CD8⁺ en périphérie³²². L'ensemble de ces études suggère que les CTL CD4⁺ ou CD8⁺ sont à l'origine des lymphocytes T DN B220⁺³²³.

.V.2.b Fonctions régulatrices des lymphocytes T DN B220⁺

Chez les souris normales, les lymphocytes T DN B220⁺ peuvent agir comme des suppresseurs d'inflammation et d'auto-immunité dans un modèle de réaction greffon contre l'hôte (GVHD, *Graft Versus Host Disease*) induite par une greffe de moelle osseuse allogénique³²⁴. Ainsi, les lymphocytes T DN B220⁺, suite à une production autocrine d'IFN- γ , augmenteraient leur taux d'expression de FasL leur permettant d'induire l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ pathogéniques responsables de la GVHD^{310,324,325}.

.V.2.c Phénotype EMRA des lymphocytes T DN B220⁺

Chez des patients atteints d'ALPS, il a été montré que les lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ sont de phénotype CD45RB^{high}CCR7⁻KLRG1⁻ mais CD27^{high}CD28^{high} (paragraphe .II.6, page 42)¹⁸². Bien que très semblable au phénotype des lymphocytes T EMRA (paragraphe .II.6, page 42) celui-ci reste spécifique des patients ALPS à cause de la persistance de l'expression d'un taux élevé de CD27 et CD28³²³.

.V.3 Le récepteur P2X7 et auto-immunité

Du fait de son importance dans l'immunité innée et adaptative, l'implication de P2X7R dans le développement des maladies auto-inflammatoires et auto-immunes est très recherchée mais avec des résultats contradictoires. Dans certains modèles de maladies auto-immunes son activation par l'ATP contribue à exacerber la maladie auto-immune alors que dans d'autres elle l'atténue^{293,301,326-329}. Dans notre laboratoire, il a été montré que les lymphocytes T DN B220⁺ pathogéniques qui s'accumulent chez les souris auto-immunes MRL/lpr sont totalement réfractaires à une stimulation par l'ATP³³⁰. Cette résistance est due à la perte d'expression du P2X7R à la membrane plasmique mais pas à son expression puisqu'il est retrouvé dans le compartiment intracellulaire. Il est important de noter que cette réduction d'expression membranaire de P2X7R ne concerne pas uniquement les lymphocytes T DN B220⁺ pathogènes des souris auto-immunes MRL/lpr mais également les lymphocytes T de souris normales ayant reçu un signal d'apoptose par la voie Fas en fin de réponse immunitaire³³⁰.

Des polymorphismes dans le gène *p2x7* augmentant l'activité du récepteur, notamment His155Tyr, sont liés au développement de la polyarthrite rhumatoïde et du LED^{331,332}. Dans la colite aigüe induite chimiquement, P2X7R possède un rôle exacerbant en induisant la mort des lymphocytes Treg Foxp3⁺³³³. À l'inverse, une autre étude a montré un rôle protecteur de P2X7R dans les colites chroniques grâce à son implication dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th17 ainsi que dans la maturation du système immunitaire de la *lamina propria* par l'ATP libéré par le microbiote^{296,297,334} (paragraphe .IV.3.c.2, page 60). Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, les macrophages et les DC présentent des taux très élevés de P2X7R corrélés avec une augmentation de leur sécrétion en IL-1 β , IL-17 et TNF- α ³³⁵. L'efficacité thérapeutique d'antagonistes du P2X7R (comme l'AZD9056) est en cours d'évaluation. Ainsi, des essais cliniques de phase 2 ont montré l'efficacité de ce traitement dans la maladie de Crohn chez des patients présentant des symptômes modérés voire sévères ainsi qu'une absence de toxicité de la molécule³³⁶. D'autres essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité des antagonistes de P2X7R dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde³³⁷.

Dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE pour *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), le modèle de sclérose en plaques le plus étudié chez la souris, des résultats contradictoires ont été obtenus sur le rôle de P2X7R dans le développement de la maladie. L'absence de concordance des résultats obtenus entre les différentes études est due à l'utilisation de souris P2X7KO de deux origines distinctes ; l'une provenant de Pfizer® et l'autre de GSK® (paragraphe .IV.3.b, page 57). Les Souris P2X7KO GSK®, dans lesquelles P2X7R est absent du SNC et des cellules de l'immunité innée,

développent une EAE de moindre intensité que les souris sauvages³³⁸. Par contre, l'absence totale de P2X7R fonctionnels dans les souris P2X7KO Pfizer® exacerbe l'auto-immunité³²⁶. L'ensemble de ces études suggèrent que l'absence de P2X7R des cellules de l'immunité innée protègerait de l'auto-immunité et son absence de l'ensemble du système immunitaire, notamment les cellules de l'immunité adaptative, amplifierait l'auto-immunité.

.V.4 Quelques *loci* de susceptibilité liés au lupus

Le Lupus est une maladie auto-immune chronique multifactorielle causée par des facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux. Il s'agit d'une maladie systémique d'étiologie essentiellement inconnue. Une rupture de la tolérance au soi est certainement à l'origine de la production d'auto-anticorps de haute affinité pour les constituants nucléaires, d'inflammations chroniques et de destruction d'organes. Le développement de la pathologie fait intervenir aussi bien les lymphocytes T et B que les cellules de l'immunité innée¹. Une meilleure connaissance des facteurs génétiques, environnementaux et cellulaires est nécessaire pour une meilleure compréhension de l'étiologie de la maladie et aussi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui, actuellement, se limitent essentiellement à l'administration d'anti-inflammatoires et d'immunosuppresseurs non spécifiques. On dénombre, à ce jour, plus de 60 *loci* de susceptibilité au lupus (Figure 29) dont certains sont décrits ci-dessous.

.V.4.a *Dérégulations des mécanismes responsables du contrôle de la mort cellulaire*

Comme mentionné précédemment, des défauts dans les voies de signalisation contrôlant l'apoptose par les voies intrinsèque Bim (paragraphe .III.1, page 44) ou extrinsèque Fas/FasL (paragraphe .III.2, page 46) entraînent des accumulations massives de lymphocytes T accompagnées de syndromes auto-immuns (Tableau 4). La protéine pro-apoptotique Bim est impliquée dans la mort cellulaire lors du développement thymique et dans l'homéostasie des lymphocytes T périphériques. La déficience en Bim induit l'accumulation en périphérie de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés et une rupture de tolérance au soi par défaut d'élimination des lymphocytes T auto-réactifs au niveau thymique et des lymphocytes T activés en périphérie en fin de réponse immunitaire^{17,209,210,339}. Ces effets sont amplifiés si la déficience en Bim est associée à celle d'autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Puma (paragraphe .III.1, page 44)²¹¹.

Les défauts génétiques associés à la voie Fas/FasL sont les principales causes de développement du syndrome ALPS (paragraphe .V.1, page 62; paragraphe .III.2, page 46). La déficience en récepteur Fas, ou son ligand FasL, induit des syndromes auto-immuns sévères accompagnés d'infiltrations et de destructions tissulaires chez les patients atteints d'ALPS et les souris mutées dans les gènes *fas* (*lpr*) ou *fasL* (*gld*)^{231,310} (Tableau 4). Les patients ALPS et les souris *lpr* ou *gld* présentent une accumulation massive de lymphocytes T pathogéniques TCR αβ⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires (paragraphe .V.2, page 63). L'effet de ces mutations est exacerbé si elles sont associées à d'autres mutations en récepteurs de mort cellulaire. Ainsi, les souris déficientes simultanément en récepteur de mort TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) et en ligand FasL³⁴⁰ ou son récepteur Fas¹⁹⁵ présentent des syndromes auto-immuns et des lymphoaccumulations plus importantes que les souris mutées dans un seul gène ce qui démontre la contribution de la voie extrinsèque TRAIL dans l'homéostasie des lymphocytes T (Tableau 4). Comme chez les souris lupiques, 50 % des patients atteints de LED présentent des adénopathies et 10 à 46 % présentent des splénomégalies qui se manifestent principalement durant les phases d'exacerbations^{341,342}.

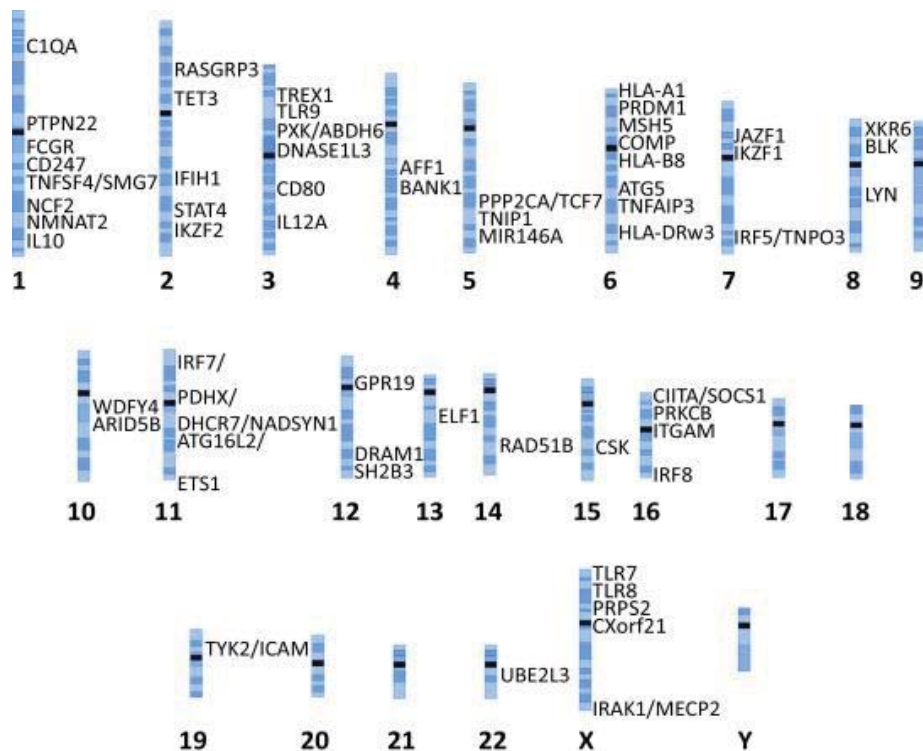


Figure 29 : Loci de susceptibilité au LED chez l'Homme
Adapté d'après Moulton et al. 2017.¹

.V.4.b Phagocytose et élimination des corps apoptotiques

Comme mentionné dans le paragraphe .III.3 (page : 49), un défaut d'élimination des corps apoptotiques peut être un élément déclencheur d'auto-immunité en rompant la tolérance à certains antigènes du soi.

.V.4.c Dérégulation de l'autophagie

L'importance de l'autophagie dans l'homéostasie lymphocytaire a amené plusieurs équipes à rechercher si une dérégulation de ce processus peut entraîner des dysfonctionnements de l'immunité. Dans la sclérose en plaques (SEP), il a été décrit dans les lymphocytes T infiltrant les lésions tissulaires une forte augmentation de l'expression de la protéine ATG5 impliquée dans l'élongation de l'autophagosome^{343,344}. Dans le LED, un polymorphisme génétique dans la région du gène *ATG5* a été associé au développement de la pathologie³⁴⁵. De plus, l'autophagie est dérégulée dans les lymphocytes T des patients atteints de LED et des modèles murins de lupus dont celui de la souris *MRL/lpr*³⁴⁶⁻³⁴⁹. La nature de cette dérégulation est complexe et pas encore complètement définie car elle varie avec le type cellulaire et son état d'activation, le contexte inflammatoire notamment cytokinique et le modèle expérimental utilisé. Il est cependant intéressant de noter que l'immunosuppresseur rapamycine (en essai clinique dans le LED) et l'hydroxychloroquine (utilisé en traitement de fond dans le LED) agissent sur l'autophagie^{350,351}.

.V.4.d Défauts de régulation et de tolérance

.V.4.d.1 Facteur de transcription *Foxp3*

Les lymphocytes Treg *Foxp3*⁺ jouent un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire et l'homéostasie des lymphocytes T (paragraphe .II.3.a., page 37). La mutation récessive liée à l'*X scurfy* du gène codant le facteur de transcription *Foxp3* induit un syndrome auto-immun très sévère et rapidement létal pour les souris³⁵² (Tableau 4). Les souris *scurfy* présentent des lésions cutanées, une inflammation des glandes lacrymales, une splénomégalie et des adénopathies et meurent vers l'âge de 3 semaines. Cette mutation est à l'origine de l'identification du gène codant le facteur transcription *Foxp3* et de la découverte de son rôle dans l'inhibition et la régulation des réponses immunitaires³⁵³.

.V.4.d.2 Molécule de coinhibition *CTLA-4*

Le rôle de la molécule de coinhibition *CTLA-4* (CD152) est essentiel dans la régulation des réponses immunitaires par les lymphocytes Treg et l'arrêt de l'expansion clonale des lymphocytes T conventionnels

activés (Figure 30, paragraphe .II.2.b , page 27). Un renouvellement continu du pool de molécules CTLA-4 est observée à la surface des lymphocytes Tconv activés et Treg³⁵⁴. Chez la souris, la déficience en CTLA-4 cause un syndrome lymphoprolifératif et auto-immun sévère avec des infiltrations lymphocytaires et des destructions tissulaires semblables aux souris déficientes en Foxp3^{355,356} (Tableau 4). Chez l'Homme, des délétions dans le gène codant CTLA-4, même à l'état hétérozygote, causent des désordres immunitaires avec des infiltrations lymphocytaires appelés syndrome CHAI (*CTLA-4 Haploinsufficiency with Autoimmune Infiltration*)³⁵⁷. Des mutations à l'état homozygote du gène codant pour la protéine LRBA (*Lipopolysaccharide-Responsive vesicle trafficking, Beach- and Anchor-containing*), impliqué dans l'adressage de CTLA-4 à la membrane, conduit aux mêmes désordres auto-immuns que ceux du syndrome CHAI³⁵⁸ (Figure 30). L'accumulation de lymphocytes T chez les souris déficientes en CTLA-4 concerne aussi bien les sous-populations CD4⁺ que CD8⁺ mais à la différence des mutation *lpr* et *gld* ces cellules n'acquièrent pas un phénotype DN³⁵⁵.

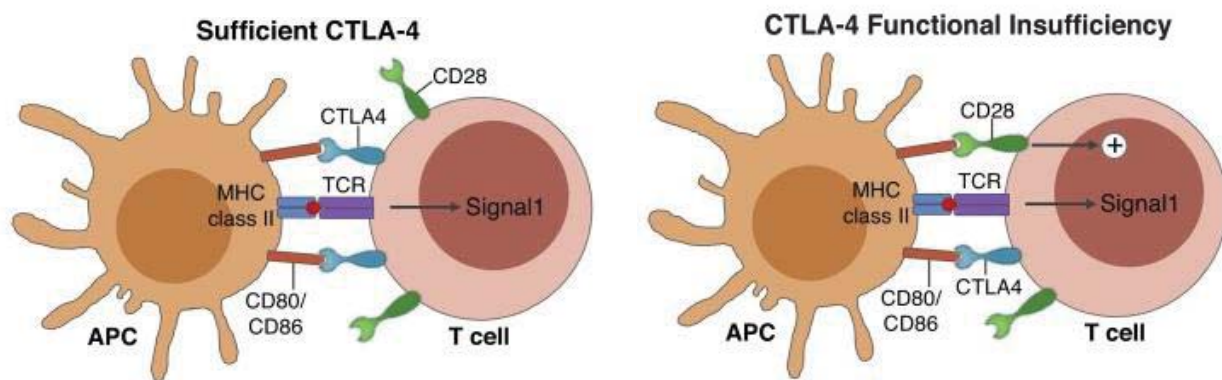


Figure 30: Rôle du récepteur CTLA-4 dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T

Les molécules CTLA-4 sont des inhibiteurs compétitifs des molécules de costimulation CD28 (partie gauche de la figure). En cas de défaut d'expression en molécules CTLA-4, les molécules CD28 continuent de délivrer leur signal coactivateur des lymphocytes T (Partie droite de la figure).³⁵⁴

.V.4.d.3 Facteurs de transcription AIRE et Fezf2

Le facteur de transcription AIRE exprimé spécifiquement par les TEC est essentiel pour l'établissement de la tolérance centrale par son implication dans la présentation antigénique des peptides du soi lors de la sélection négative dans le thymus (paragraphe .I.2.b, page 17). La déficience en AIRE induit un syndrome auto-immun sévère (APECED : *Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy* ou polyendocrinopathie auto-immune de type 1) avec destructions tissulaires touchant principalement les gonades, les glandes salivaires et lacrymales, le pancréas, les glandes surrénales, thyroïdes et parathyroïdes⁴³ (Tableau 4). Le syndrome APECED est une maladie rare, plus fréquente dans

certaines populations en raison d'un taux de consanguinité élevé. La prévalence dans le nord-ouest de la France a été évaluée à 1/500 000 (Orphanet). Plus récemment, il a été montré que le syndrome APECED peut également se développer en absence du facteur de transcription Fezf2 (*Fez family zinc finger 2*) impliqué dans la maturation des mTEC^{374,375} (Tableau 4).

.V.4.e NETose et lupus

La NETose est un mécanisme de mort cellulaire, spécifique des neutrophiles, activé par les TLR, les récepteurs à Fc, les autoanticorps ou encore les cytokines IL-8, TNF- α et IFN de type I et II. La mort par NETose induit la libération par les neutrophiles de leur chromatine décondensée ce qui piège et tue les bactéries extracellulaires du foyer inflammatoire³⁵⁹. La NETose est le résultat de la rupture des différentes membranes cellulaires dont l'enveloppe nucléaire, les membranes des lysosomes et la membrane plasmique. Les NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) sont composés d'ADN, d'Histones et des protéines des neutrophiles. La mort par NETose est activée suite à la libération, dans le cytosol, du Ca²⁺ du RE ce qui active la PKC qui à son tour stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NO). Chez les patients atteints de LED, en plus des auto-anticorps anti-ADNdb, les patients développent des auto-anticorps spécifiques des protéines lysosomales des neutrophiles dont la Myélopéroxydase et la Proteinase-3³⁶⁰⁻³⁶². L'élimination rapide des NET est nécessaire pour éviter une rupture de tolérance aux constituants cellulaires des neutrophiles et le développement de maladie auto-immunes de type lupique³⁶². Leur dégradation est assurée par la DNase I plasmatique dont la présence et/ou l'activité sont réduites chez les patients atteints de LED ainsi que dans les modèles murins comme celui des souris F1 (NZB x NZW)^{232,363} (Tableau 4). Des processus très similaires à la NETose, et appelés ETose (ET, *Extracellular Traps*), sont retrouvés dans les mastocytes et les éosinophiles.

.V.4.f Autoanticorps et lupus

La présence d'autoanticorps de haute affinité contre les constituants nucléaires est une caractéristique du lupus. Il s'agit notamment d'anticorps anti-ADNdb et anti-protéines ribonucléaires (anti-Su, anti-Sm, and anti-U1RNP). On retrouve également le facteur rhumatoïde qui est constitué principalement d'IgM (mais pas uniquement) dirigé contre les parties Fc des IgG³⁶⁴. Les anticorps antinucléaires sont détectables plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. Leur spécificité et leur titre augmentent progressivement au cours du temps culminant avec l'apparition des premiers symptômes cliniques. Pour l'essentiel, ces autoanticorps induisent des lésions tissulaires par le biais de la formation de complexes immuns et le recrutement du complément en particulier dans la glomérulonéphrite lupique.

Cependant, des modèles murins ont montré que la glomérulonéphrite lupique pouvait se développer en absence d'autoanticorps antinucléaires³⁶⁵. Il est important de noter que la majorité des antigènes contre lesquels les patients lupiques développent des autoanticorps sont regroupés spatialement dans les corps apoptotiques³⁶⁶ renforçant l'hypothèse que les défauts des voies d'apoptose sont un facteur déclenchant du lupus. De plus, certains patients lupiques possèdent des auto-anticorps anti-SRA (scavenger receptor A) capables d'inhiber la phagocytose des corps apoptotiques³⁶⁷. Enfin, les modèles de souris comme la MRL/*lpr* sont caractérisés par des taux élevés de la cytokine BAFF (*B cell Activating Factor*) impliquée dans le développement, l'activation et la survie des lymphocytes B et dont les taux sont corrélés avec le développement d'une glomérulonéphrite³⁶⁸. La tyrosine kinase de Bruton (Btk, *Bruton's tyrosine kinase*) joue un rôle important dans la transduction du signal du BCR (*B Cell Receptor*), des récepteurs à Fc, et des TLR. Dans le lupus, elle amplifie l'activation, la différenciation en plasmocytes et la commutation de classes des lymphocytes B auto-réactifs. D'ailleurs, son inhibition réduit efficacement les taux d'autoanticorps, l'activation des lymphocytes B et les atteintes rénales dans différentes lignées de souris lupiques dont les MRL/*lpr* et les F1 (NZB x NZW)³⁷⁰. D'après ces études, on peut conclure que la kinase Btk est essentielle pour le maintien de la tolérance des lymphocytes B. Les souris lupiques et les patients atteints de LED présentent une proportion élevée de lymphocytes Tfh qui corrèle avec la sévérité de la maladie³⁶⁹. De ce fait, des thérapies visant à moduler le nombre de lymphocytes Tfh ont été proposées en ciblant principalement l'IL-21 et les molécules de costimulation ICOS et OX40 nécessaires pour leur développement³⁷⁰. Chez les souris lupiques B6.Sle1.*Yaa* (*Y-linked Autoimmune Accelerating*), les traitements par des anticorps anti-IL-21 ou anti-IL-21R-soluble réduisent la taille des centres germinatifs, lieux d'hypermutation somatique et de la commutation isotypique des lymphocytes B, le nombre de plasmocytes ainsi que la production d'autoanticorps de type IgG2c confirmant l'implication des lymphocytes Tfh dans le développement du lupus³⁷¹. Les traitements avec des anticorps anti-ICOS ont donné des résultats similaires chez les souris lupiques F1 (NZB x NZW)³⁷². Il a été également montré que la déficience en ICOS, spécifiquement dans les cellules de la lignées myéloïde CD11c⁺, atténue les glomérulonéphrites et les inflammations pulmonaires chez les souris MRL/*lpr*^{370,373}. Dans le modèle de souris lupique B6.Sle1.*Yaa*, le gène codant TLR7 est dupliqué suite à une translocation entre les chromosomes X et Y. Le récepteur TLR7 est impliqué dans reconnaissance de l'ARN viral simple brin. Sa duplication entraîne une activation des lymphocytes B auto-réactifs en leur fournissant de façon non spécifique un deuxième signal d'activation^{364,376} (Tableau 4).

.V.4.g Cytokines et lupus

Les cytokines jouent un rôle important dans l'apparition et le développement des maladies auto-immunes et leurs taux sont corrélés avec la sévérité de la maladie.

.V.4.g.1 Interférons de type I et de type II

Les patients atteints de syndromes auto-immuns présentent des taux élevés en IFN de type I et/ou II ^{377,379}. Des taux sériques particulièrement importants IFN- α sont retrouvés chez les patients lupiques en corrélation avec la sévérité des glomérulonéphrites et des taux d'auto-anticorps anti-ADNdb ³⁷⁸. L'IFN- α est produit principalement par les pDC suite à leur activation par les complexes immuns caractéristiques du LED ³⁷⁹. L'IFN- α participe à la maturation des DC myéloïdes, la production et/ou la sécrétion des cytokines de type Th1 (IFN- γ), de BAFF et d'IL-10 ainsi que la commutation de classes des auto-anticorps ^{379,380}. De plus, l'injection d'IFN- γ exacerbe le syndrome auto-immun des souris F1 (NZB x NZW) ³⁸⁴ et la déficience en IFN- γ ou son récepteurs atténue la maladie ^{385,386}. Les souris lupiques NZW déficientes pour les récepteurs aux IFN- α/β présentent des atteintes rénales et une mortalité moins importante ³⁸¹. À l'inverse, la surexpression d'IFN- α accélère le développement de la maladie dans les souris F1 (NZB x NZW) ³⁸². Cependant, les souris MRL/*lpr* déficientes pour les IFN de type I présentent une lymphoprolifération et une production d'auto-anticorps accrues démontrant la complexité du rôle des cytokines dans le développement du lupus ³⁸³.

.V.4.g.2 Cytokines proinflammatoires

Les cytokines proinflammatoires IL-1 β et IL-18 sont présentes à des taux élevés dans les sérums des patients atteints de LED et leurs taux sont corrélés avec la sévérité de la maladie. Elles sont principalement sécrétées par les kératinocytes et les macrophages des sites inflammatoires et sont responsables du recrutement des cellules immunitaires vers ces sites. Elles stimulent également la production des cytokines inflammatoires TNF- α et d'IFN- γ ³⁸⁹. L'IL-12 est une cytokine proinflammatoire impliquée dans la différenciation et la survie des lymphocytes Th1 et des CTL (paragraphe .II.2.c.1.1 et .II.2.c.3 ; pages 29 et 32). Chez les souris MRL/*lpr*, son taux sérique est élevé et corrélé avec les atteintes rénales ³⁷⁹. Des résultats similaires ont été observés chez les patients atteints de LED ^{389,391}. De plus, il a été montré une corrélation entre des taux élevés de la sous-unité p40 de l'IL-12 et la sévérité de la pathologie ³⁹². L'IL-17 est une cytokine proinflammatoire produite par les lymphocytes Th17 sous six isoformes différentes : IL-17A à F. Elle est fortement exprimée au niveau des lésions cutanées et son taux sérique est élevé chez les patients atteints de LED ³⁸⁹. Ces taux sont corrélés avec la sévérité de la maladie,

les taux d'autoanticorps ainsi que ceux de cytokines proinflammatoires et de certaines chimiokines comme la CXCL10 impliquée dans le recrutement des CTL dans les tissus enflammés ³⁹³. Chez les souris B6//*lpr*, la réduction des taux sériques d'IL-17 suite à une déficience en récepteurs à l'IL-23, qui est impliqué dans le développement des lymphocytes Th17 (paragraphe .II.2.c.2, page 30), entraîne une réduction de la proportion des lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ et de la sévérité des glomérulonéphrites ^{393,394}.

.V.4.g.3 Cytokines immuno-régulatrices

Un faible taux d'IL-2 sérique est observé chez les patients et les souris lupiques. Ce déficit serait responsable d'une diminution du nombre de lymphocytes Treg dont le rôle est essentiel dans le contrôle de l'auto-immunité ¹. Des essais cliniques de phase II sont actuellement en cours pour déterminer si les injections d'IL-2 à faibles doses ne permettraient pas d'augmenter le nombre de lymphocytes Treg et par voies de conséquence de traiter le LED. De plus, il a été montré que les patients atteints de LED présentent des taux sériques élevés en récepteurs solubles de haute affinité à IL-2 (IL-2R α) qui corrèlent avec la glomérulonéphrite à complexes immuns et le taux d'auto-anticorps anti-ADNdb ³⁷⁹ ce qui expliquerait, en partie, le déficit en IL-2 observé sachant que des dérégulations d'expression et d'activation de facteurs de transcription CREB et CREM ont été rapportés ³⁹⁰. L'IL-10 est une cytokine produite par les lymphocytes T CD4⁺, les lymphocytes B et les macrophages ³⁸⁷. L'IL-10 est généralement considérée comme une cytokine anti-inflammatoire par sa capacité à inhiber les fonctions des lymphocytes Th1, des macrophages et des DC inflammatoires. Cependant, elle stimule également l'activité et la prolifération des lymphocytes B. Son taux d'expression est extrêmement élevé chez les patients atteints de LED et leurs modèles animaux ³⁸⁸. Les taux en IL-10 sont corrélés avec ceux des auto-anticorps anti-ADNdb ³⁸⁹. Les taux d'IL-6 sériques sont également considérés comme un biomarqueur de la LED. Elle est sécrétée principalement par les macrophages et les lymphocytes B activés et participe à la maturation des lymphocytes B et la différenciation des CTL et des lymphocytes Th17 ³⁸⁹.

Tableau 4 : Principales molécules de l'homéostasie des lymphocytes T et de la réponse immunitaire impliquées dans le développement de syndromes auto-immuns

	Fonctions cellulaires	Fonctions immunitaires	Syndromes associés	Références
Bim	Protéine proapoptotique	homéostasie des lymphocytes T et tolérance centrale	Auto-immunité et lymphoaccumulation T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	Bouillet <i>et al.</i> Nature, 2002
Bim+Bfm	Protéine proapoptotique	tolérance centrale	Auto-immunité et lymphoaccumulation exacerbée chez les souris Bim ^{-/-}	Labi <i>et al.</i> Blood, 2014
Bim+Puma	Protéine proapoptotique	tolérance centrale	Auto-immunité et lymphoaccumulation exacerbée chez les souris Bim ^{-/-}	Erlacher <i>et al.</i> J Exp Med, 2006
Foxp3	Facteur de transcription	tolérance et régulation négative de la réponse immunitaire	Auto-immunité systémique sévère et lymphoprolifération T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	Clark <i>et al.</i> J Immunol, 1999
AIRE et Fezf2	Facteurs de transcription	présentation d'antigènes du soi et tolérance centrale	Auto-immunité généralisée	Anderson <i>et al.</i> Science, 2002 Takaba <i>et al.</i> Cell, 2015
Fas ou FasL	Récepteur de mort cellulaire et son ligand	homéostasie des lymphocytes T	ALPS, Auto-immunité et lymphoaccumulation principalement de lymphocytes T DN B220 ⁺	Watanabe <i>et al.</i> Nature, 1992; Sneller <i>et al.</i> JCI, 1992.
TRAIL	Ligand de récepteurs de mort cellulaire	homéostasie des thymocytes	Exacerbation de la polyarthrite rhumatoïde	Lamhamedi-Cherradi <i>et al.</i> Nat Immunol, 2003
FasL + TRAIL	Ligands de récepteurs de mort cellulaire	homéostasie des lymphocytes T	Auto-immunité, lymphoaccumulation et ALPS exacerbés	Sedjer <i>et al.</i> Blood, 2010
Fas + P2X7R	Apoptose extrinsèque, activation des lymphocytes T et de l'inflammasome	homéostasie des lymphocytes T	Auto-immunité, lymphoaccumulation et ALPS exacerbés	Mellouk <i>et al.</i> En préparation
Caspase 10	Protéine proapoptotique	homéostasie des lymphocytes T	Auto-immunité et lymphoaccumulation	Wang <i>et al.</i> Cell, 1999
DNase I	Nucléase	dégradation de l'ADN extracellulaire dans les sites inflammatoires	Auto-anticorps anti-ADNdb	Macavonic <i>et al.</i> Clin Exp Immunol, 1997
DNase II	ADNase	dégradation de l'ADN des cellules apoptotiques phagocytées	Polyarthrite chronique	Kawane <i>et al.</i> Nature, 2006
CCR7/CCL19 /CCL21	Chimiokines et leurs récepteurs	migration des lymphocytes et des thymocytes	Auto-immunité des glandes lacrymales et salivaires (syndrome de Sjögren)	Kurobe <i>et al.</i> Immunity, 2006
TAM (Tyro-3, Axl et Mertk)	Récepteurs à tyrosines kinases	Récepteurs des corps apoptotiques	Auto-immunité systémique, lupus, anticorps anti-acides nucléiques, anti-protéines nucléaire et autres composants cellulaires	Cohen <i>et al.</i> J Exp Med, 2002
CTLA-4	Molécule de coinhibition	régulation négative de la réponse immunitaire	Auto-immunité systémique sévère et lymphoprolifération T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	Tivol <i>et al.</i> Immunity, 1995
TGF-β	Cytokine anti-inflammatoire	régulation négative de la réponse immunitaire	Auto-immunité systémique	Li <i>et al.</i> Immunity, 2006
TLR7	Récepteur d'ARN viral	immunité anti-virale	Sa duplication induit des auto-anticorps auto-immuns	Fairhurst <i>et al.</i> Eur J Immunol, 2008

Objectifs

Notre équipe étudie l'étiologie des pathologies auto-immunes et inflammatoires dans le modèle des souris MRL/*lpr*. Les pathologies sévères développées par ces souris sont dues à l'accumulation en périphérie de lymphocytes T DN B220⁺ exprimant un récepteur d'apoptose Fas inactif (mutation *lpr*). De façon inattendue, nous avons montré que ces lymphocytes T ont une déficience dans l'expression membranaire du récepteur purinergique P2X7 impliqué dans la maturation des cytokines inflammatoires pro-IL-1 β et pro-IL-18³³⁰ et le clivage protéolytique de la molécule de *homing* CD62L²⁷⁴. D'autre part, il a été montré que *p2rx7* est un *locus* de susceptibilité au lupus³³¹. Nos résultats nous ont amené à postuler que P2X7R jouerait, en synergie avec Fas, un rôle clef dans l'homéostasie des lymphocytes T et par voie de conséquence le développement du lupus. Pour vérifier notre hypothèse nous avons produit, dans le fond génétique B6, des souris inactivées pour les deux récepteurs, Fas et P2X7 (B6/*lpr*-P2X7KO). Nous avons recherché chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO la présence des paramètres biologiques (cytokines, auto-anticorps, populations cellulaires) et cliniques (adénopathies, inflammations, lésions tissulaires) caractéristiques des souris MRL/*lpr*. En parallèle, nous avons tenté d'identifier les mécanismes responsables de l'accumulation des lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ et de mieux préciser leur origine lymphocytaire CD4 et/ou CD8 ainsi que leur stade d'activation et de différenciation. L'impact sur le réseau cytokinique de l'absence d'expression de Fas et/ou P2X7R a également été déterminé dans les fonds génétiques MRL et B6. De plus, nous avons caractérisé le transcriptome (RNAseq et RT-QPCR) des rates de souris B6/*lpr*-P2X7KO en comparaison avec celui des souris B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO et MRL/*lpr* avant et après développement de la pathologie. L'impact de l'inactivation de Fas, de P2X7R ou des deux récepteurs sur les capacités des souris à monter une réponse immunitaire efficace contre un antigène a été évalué en immunisant les différentes lignées de souris par des adénovirus recombinants codant pour l'ovalbumine.

La perte d'expression membranaire de P2X7R par les lymphocytes T préapoptotiques B220⁺ des souris auto-immunes MRL/*lpr* mais aussi des souris normales B6, nous a conduit à étudier l'expression membranaire et les activités cellulaires induites par P2X7R en fonction du stade d'activation et de différenciation des lymphocytes T CD4⁺, conventionnels ou régulateurs Foxp3⁺, et des lymphocytes T CD8⁺. Un autre de nos objectifs a été d'identifier l'impact de la voie de signalisation ATP/P2X7R sur l'apoptose dépendante du récepteur Fas et la régulation de son expression et activation dans les lymphocytes T issus de souris B6 et B6-P2X7KO à leurs différents stades d'activation et de différenciation. Du fait de la difficulté de conduire des études mécanistiques *in vivo* et *ex vivo* nous avons sélectionné des lignées lymphocytaires

T humaines et murines pour leur capacité à exprimer le P2X7R et à présenter ou non les fonctions cellulaires induites par l'ATP. La nature de l'isoforme (α et κ) de P2X7R exprimé par ces lignées a été déterminée au niveau protéique et nucléotidique.

Articles

.I Variations in cellular responses of mouse T cells to ATP stimulation do not depend on P2X7 receptor expression levels but on their activation and differentiation stage

Hanaa Safya, Amine Mellouk, Julie Legrand, Sylvain M. Le Gall, Mohcine Benbijja, Colette Kanellopoulos-Langevin, Jean M. Kanellopoulos et Pierre Bobé.

Frontiers in Immunology, 2018

.I.1 Résumé

Dans ce travail nous démontrons que, chez la souris, l'intensité des activités cellulaires induites par la stimulation du P2X7R par l'ATP varie avec le stade d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et cela indépendamment de son taux d'expression membranaire. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} expriment peu de P2X7R à leur surface et présentent des taux faibles d'externalisation de PS et de formation des pores non sélectifs mais clivent efficacement CD62L en réponse à l'ATP extracellulaire. Par ailleurs, les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{low} et Treg Foxp3⁺ expriment des taux élevés de P2X7R et présentent des taux élevés d'externalisation des PS, de formation des pores et de clivage de CD62L en réponse à l'ATP. Enfin, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} et effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{low}, récemment activés CD69⁺, présentent des taux plus élevés en P2X7R à la membrane mais sont déficients pour le clivage de CD62L en réponse à l'ATP. Les activités cellulaires induites par P2X7R ne suivent donc pas, à l'inverse de ce qui est généralement considéré, une loi du tout ou rien notamment dans le cas du clivage de CD62L par les métalloprotéases. Cette disparité fonctionnelle entre les sous-populations de lymphocytes T n'est pas due à des différences de taux d'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 à la surface des lymphocytes T qui sont des régulateurs importants de l'activation du P2X7R.



Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage

Hanaa Safya¹, Amine Mellouk¹, Julie Legrand², Sylvain M. Le Gall^{2,3}, Mohcine Benbija^{2,4}, Colette Kanellopoulos-Langevin⁵, Jean M. Kanellopoulos⁶ and Pierre Bobé^{1,2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Amit Awasthi,
Translational Health Science and
Technology Institute, India

Reviewed by:

Ashutosh Chaudhry,
Memorial Sloan Kettering Cancer
Center, United States
Girdhari Lal,
National Centre for
Cell Science, India

*Correspondence:

Pierre Bobé
pierre.bobe@u-psud.fr

Specialty section:

This article was submitted
to T Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 11 August 2017

Accepted: 08 February 2018

Published: 27 February 2018

Citation:

Safya H, Mellouk A, Legrand J,
Le Gall SM, Benbija M,
Kanellopoulos-Langevin C,
Kanellopoulos JM and Bobé P (2018)
Variations in Cellular Responses of
Mouse T Cells to Adenosine-5'-
Triphosphate Stimulation Do Not
Depend on P2X7 Receptor
Expression Levels but on Their
Activation and Differentiation Stage.
Front. Immunol. 9:360.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00360

¹UMR1174, INSERM, Université Paris-Sud, Orsay, France, ²Institut André Lwoff, CNRS, Université Paris-Sud, Villejuif, France, ³UMR 970, INSERM, Université Paris Descartes, Paris, France, ⁴UMR 1012, INSERM, Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, France, ⁵UMR 1149, INSERM, Université Paris Diderot, Paris, France, ⁶UMR 9198, I2BC, CNRS, Université Paris-Sud, Orsay, France

A previous report has shown that regulatory T cells (Treg) were markedly more sensitive to adenosine-5'-triphosphate (ATP) than conventional T cells (Tconv). Another one has shown that Tregs and CD45RB^{low} Tconvs, but not CD45RB^{high} Tconvs, displayed similar high sensitivity to ATP. We have previously reported that CD45RB^{low} Tconvs expressing B220/CD45RABC molecules in a pre-apoptotic stage are resistant to ATP stimulation due to the loss of P2X7 receptor (P2X7R) membrane expression. To gain a clearer picture on T-cell sensitivity to ATP, we have quantified four different cellular activities triggered by ATP in mouse T cells at different stages of activation/differentiation, in correlation with levels of P2X7R membrane expression. P2X7R expression significantly increases on Tconvs during differentiation from naive CD45RB^{high}CD44^{low} to effector/memory CD45RB^{low}CD44^{high} stage. Maximum levels of upregulation are reached on recently activated CD69⁺ naive and memory Tconvs. Ectonucleotidases CD39 and CD73 expression levels increase in parallel with those of P2X7R. Recently activated CD69⁺ CD45RB^{high}CD44^{low} Tconvs, although expressing high levels of P2X7R, fail to cleave homing receptor CD62L after ATP treatment, but efficiently form pores and externalize phosphatidylserine (PS). In contrast, naive CD45RB^{high}CD44^{low} Tconvs cleave CD62L with high efficiency although they express a lower level of P2X7, thus suggesting that P2X7R levels are not a limiting factor for signaling ATP-induced cellular responses. Contrary to common assumption, P2X7R-mediated cellular activities in mouse Tconvs are not triggered in an all-or-none manner, but depend on their stage of activation/differentiation. Compared to CD45RB^{low} Tconvs, CD45RB^{low}Foxp3⁺ Tregs show significantly higher levels of P2X7R membrane expression and of sensitivity to ATP as evidenced by

Abbreviations: ConA, concanavalin A; mAb, monoclonal antibody; P2X7R, P2X7 receptor; PS, phosphatidylserine; Treg, regulatory T lymphocyte; Tconv, conventional T lymphocyte.

their high levels of CD62L shedding, pore formation and PS externalization observed after ATP treatment. In summary, the different abilities of ATP-treated Tconvs to form pore or cleave CD62L depending on their activation and differentiation state suggests that P2X7R signaling varies according to the physiological role of T convs during antigen activation in secondary lymphoid organs or trafficking to inflammatory sites.

Keywords: P2X7, CD39, CD73, regulatory T lymphocyte, CD62L shedding, pore formation, phosphatidylserine exposure, cell death

INTRODUCTION

The P2X7 receptor (P2X7R) belongs to the P2X receptor family of adenosine-5'-triphosphate (ATP)-gated cation channels. The type of molecular and cellular responses induced by P2X7R depends on the length of stimulation by 0.5–1 mM concentrations of ATP in its tetra-anionic form (ATP⁴⁻) (1). Since P2X7R plays a major role in both innate and adaptive immunity, its involvement in the development of inflammatory and autoimmune diseases is extensively studied. Moreover, there is an increasing interest in the potential of P2X7R antagonists to treat a variety of inflammatory conditions (2). However, protective or detrimental effects of P2X7R on disease onset and/or development have been observed (3, 4). These seemingly contradictory reports emphasize the need for an in-depth investigation on how the various cellular functions triggered by the ATP/P2X7R signaling pathway are regulated in immune cells under normal and pathological situations. Brief stimulation of P2X7R induces cation-specific ion channels formation (5) and phosphatidylserine (PS) exposure in the plasma membrane (6). Prolonged activation of P2X7R results in the formation of nonselective membrane pores, permeable to molecules with a molecular mass up to 900 Da. Continuous activation of P2X7R can lead to cell death by apoptosis (7–9) and/or necrosis (10, 11), depending on the cell type. In contrast, P2X7R may trigger an anti-apoptotic or growth promoting activity (12, 13). Numerous physiological functions have been attributed to P2X7R; notably, activation of caspase-1 (14, 15), maturation and secretion of cytokines such as IL-1 β , IL-18, IL-6, and TNF- α (3, 14, 16–18), migration of leukocytes (19), and killing of intracellular pathogens in macrophages (20, 21). Moreover, P2X7R activation triggers proteolytic cleavage of membrane proteins such as the homing receptor L-selectin (CD62L), the low affinity receptor for IgE (CD23) (22, 23), TNF- α (24), IL-6 receptor (25), and the amyloid precursor protein (26). P2X7R also regulates the early signaling events involved in T-cell activation. Upon antigen stimulation, T lymphocytes release ATP, which induces Ca²⁺ influx, NF-AT activation, and IL-2 production through P2X7R activation (27–30). Moreover, ATP plays a crucial role in regulating the differentiation of CD4⁺ T cells into Th17 cells (31, 32). During chronic inflammation, ATP could also facilitate the conversion of regulatory CD4⁺ T cells (Treg) into Th17 cells (33). Sensitivity to ATP varies among different T-cell subpopulations. Thus, CD8⁺ T cells from the spleen, lymph nodes, or liver exhibit low levels of P2X7R membrane expression and ATP sensitivity, whereas both are displayed at high levels in intestinal CD8⁺ T cells (34). Concerning CD4 Tregs, although

significantly higher levels of *p2X7* mRNA were found in CD4⁺ Tregs compared to CD4⁺ conventional T lymphocyte (Tconvs) (33), contradictory reports have been published about their sensitivity to P2X7R-induced cell death. In one report, CD25⁺CD4⁺ Tregs are markedly more sensitive to P2X7R stimulation than CD25⁻CD4⁺ Tconv (35). In another, the sensitivity of CD4⁺ Tregs to P2X7R stimulation is normal and similar to that of CD4⁺ Tconvs, provided that the latter express, like Tregs, low levels of the RB isoform of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 (CD45RB) (36). In Tconvs, the sensitivity to ATP-induced PS externalization and cell death appears to inversely correlate with the levels of CD45RB membrane expression. Thus, CD4⁺ T cells expressing low levels of CD45RB (CD45RB^{low}) are significantly more sensitive to ATP stimulation than their counterpart expressing high levels of CD45RB (CD45RB^{high}) (36, 37). However, the levels of P2X7R membrane expression were not determined in these studies. Moreover, we have shown that effector T lymphocytes become totally resistant to P2X7R stimulation following the plasma membrane expression of the B220 isoform of CD45 (or CD45RABC) (38) during the process of activation-induced cell death (39–41). The resistance of B220⁺ T lymphocytes to ATP stimulation is due to the loss of P2X7R expression at the plasma membrane, as it is retained in the cytosol (38).

High and low levels of CD45RB expression on mouse T cells are a feature of naive and antigen-activated cells, respectively (42). Therefore, one could conclude from previous reports (36, 37) that activated T cells (CD45RB^{low}) are more sensitive to ATP-induced PS externalization and cell death than naive T cells (CD45RB^{high}). However, we found that recently activated naive CD69⁺CD45RB^{high}CD44^{low} Tconvs show a significantly reduced ability to proteolytically cleave CD62L compared to naive CD69⁻CD45RB^{high}CD44^{low} T cells although they express higher levels of P2X7R. The reverse situation was observed for ATP-induced pore formation, and to a lesser extent for PS externalization, which were significantly upregulated in recently activated naive compared to naive Tconvs. To our knowledge, this is the first report describing a complete dissociation of ATP-induced cellular activities during the activation and/or differentiation of Tconvs, regardless of the levels of P2X7R and ectonucleotidases CD39 and CD73 membrane expression. Compared to CD45RB^{low} Tconvs, Foxp3⁺ Tregs that have an activated phenotype (CD45RB^{low} or CD25⁺) show higher levels of P2X7R membrane expression and of sensitivity to ATP. Thus, our present data show that the regulation of T cell sensitivity to ATP is far more complex than previously considered, as we found that P2X7R-mediated cellular activities in T-cell subsets are not

dependent on the levels of P2X7R membrane expression and not triggered in an all-or-none manner. They depend on their stage of activation/differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Adenosine-5'-triphosphate, phorbol myristate acetate (PMA), concanavalin A (ConA), EGTA, and KN-62 (1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). YO-PRO-1 and YO-PRO-3 dyes and BAPTA-AM were from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Metalloprotease inhibitor GM6001 was from Chemicon International (Temecula, CA, USA). ATP solutions were prepared extemporaneously from 100 mM stock solution (pH 7.4) stored at -20°C . Because divalent ions affect the potency of ATP^{4-} to bind P2X7R, the cell medium used to activate P2X7R contains low concentrations of Mg^{2+} .

Mice

Wild-type C57BL/6J (B6) and *P2rx7* knockout B6.129P2-*P2rx7^{tm1Gab}/J* (P2X7R KO) (16) mice originally from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) were maintained in our animal facilities (CNRS SEAT UPS44, Villejuif, France and animalerie NeuroPSI, Orsay, France). B6.Cg-*Foxp3^{tm1Mal}/J* (Foxp3GFP) (43) mice were kindly provided by Dr Géraldine Schlecht-Louf (INSERM UMR 996, France). All the experiments were conducted in accordance with French (décret n° 2013-118) and EU (directive 86/609/EEC) guidelines for the care of laboratory animals and approved by our local research ethics committee (CEEA 59).

Flow Cytometry Immunophenotyping Assays

Spleen cell suspensions were phenotyped by flow cytometry using fluorescent-conjugated monoclonal antibody (mAb): anti-CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-CD45RA (Clone 14.8), anti-CD45RB (clone C363.16A), anti-CD45RC (C363-16A), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD62L (clone MEL-14), anti-CD197/CC-chemokine receptor 7 (CCR7) (clone 4B12), CD39 (clone 24DMS1), and CD73 (clone TY/11.8) (all from eBioscience). P2X7R was detected using a rabbit polyclonal anti-P2X7R serum described in Le Gall et al. (38) and fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies (eBioscience). Fluorescent-conjugated rat IgG2a, IgG2b or Armenian hamster IgG mAbs were used as the isotype control (eBioscience). Use of mAb to mouse Fcγ receptor (eBioscience) avoided non-specific antibody binding. Data acquisition was performed at the Flow cytometry core facility at I2BC, CNRS UMR 9198.

CD62L Shedding, PS Exposure, Pore Formation, and Cell Death Assays

Spleen cells suspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen, France) were treated with ATP or PMA in a humidified 5% CO₂

atmosphere at 37°C for 30 min or 2 h, depending on the assay. After washing with RPMI 1640 medium, cells were resuspended in FACS buffer (eBioscience) and stained for 30 min on ice with phenotype-specific fluorescent mAbs and fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb to assess CD62L shedding. PS cell surface exposure was detected on mAb-labeled cells using FITC- or PE-Annexin V apoptosis detection kit according to the manufacturer's specifications (eBioscience, France). To quantify P2X7R-mediated pore formation, ATP treatment was performed in the presence of either the green-fluorescent YO-PRO-1 (molecular weight 629 Da) or the orange-fluorescent YO-PRO-3 (molecular weight 655 Da) nucleic acid dyes, depending on the fluorochromes used in the phenotyping step. Cell morphology (FSC/SSC) and Annexin V staining were used to quantify dead/dying cells (Annexin V⁺ FSC^{low} SSC^{high}) by flow cytometry. In some experiments, cells were pretreated with metalloprotease inhibitor GM6001, P2X7R antagonist KN-62, intracellular calcium chelator BAPTA-AM (10 μM) or extracellular calcium chelator EGTA (5 mM) for 30 min at 37°C with 5% CO₂ prior treatment with ATP or PMA.

Transfection and Flow Cytometry Assays

The COS7 epithelial cell line was transfected transiently with a pCDEF3 expression vector containing CD45RABC cDNA (kindly provided by Dr A. Weiss, UCSF, San Francisco, CA, USA). At 48 h after transfection, the cells were stained with FITC-conjugated anti-CD45RA (clone 14.8), PE-conjugated anti-CD45RB (clone 16A), APC-conjugated anti-CD45RC (clone GL24), and PE Cy5.5-conjugated anti-CD45RABC (clone RA3-6B2) mAbs, and analyzed by flow cytometry.

Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Comparisons between untreated and treated groups were made by Student's *t*-test. Degrees of significance are indicated as follows: **p* \leq 0.05, ***p* \leq 0.01, ****p* \leq 0.001.

RESULTS

ATP-Mediated Cellular Activities and P2X7R Membrane Expression in T Cells with either High or Low Expression of CD45RB

Effector T cells express low levels of the CD45RB (42). Previously, we have shown that effector CD45RB^{low} T cells become resistant to ATP stimulation when they reach a preapoptotic stage characterized by the plasma membrane expression of B220 (or CD45RABC) (38). Therefore, reports (36, 37) showing that CD45RB^{low} effector T cells are notably more sensitive to BzATP-mediated PS exposure and cell death than CD45RB^{high} naive T cells appear contradictory to our previous findings (38). The different ligands (ATP vs. BzATP) used to activate P2X7R could explain the discrepancy between our data and those of Taylor et al. However, we favor the hypothesis that the anti-CD45RB mAb used to gate CD45RB^{high} T cells in these reports (36, 37) also detect B220⁺ (or CD45RABC⁺) T cells because the anti-CD45RB

mAb (clone 16A) recognizes an exon B-dependent epitope (44). To test our hypothesis, CD45-negative COS7 epithelial cells were transfected with a plasmid vector encoding mouse CD45RABC (or B220) and stained with fluorescent anti-B220, anti-CD45RA, anti-CD45RB and anti-CD45RC mAbs. We observed that anti-CD45RB mAb recognized CD45RABC⁺ COS7 cells, but not untransfected COS7 cells (CD45RABC⁻), confirming that anti-CD45RB mAb cannot distinguish between CD45RB and CD45RABC isoforms. Likewise, anti-CD45RA

and anti-CD45RC mAbs recognized CD45RABC⁺ COS7 cells (Figure S1 in Supplementary Material). Therefore, we have quantified ATP-mediated CD62L shedding, pore formation, PS exposure and cell death in B220-negative T cells with either high or low CD45RB cell surface expression (Figure 1). In agreement with previous studies (37), we found CD45RB^{low} T cells displayed higher sensitivity to ATP-mediated PS externalization than CD45RB^{high} (Figure 1C). Moreover, CD45RB^{high} T cells displayed markedly lower sensitivity to ATP-mediated CD62L

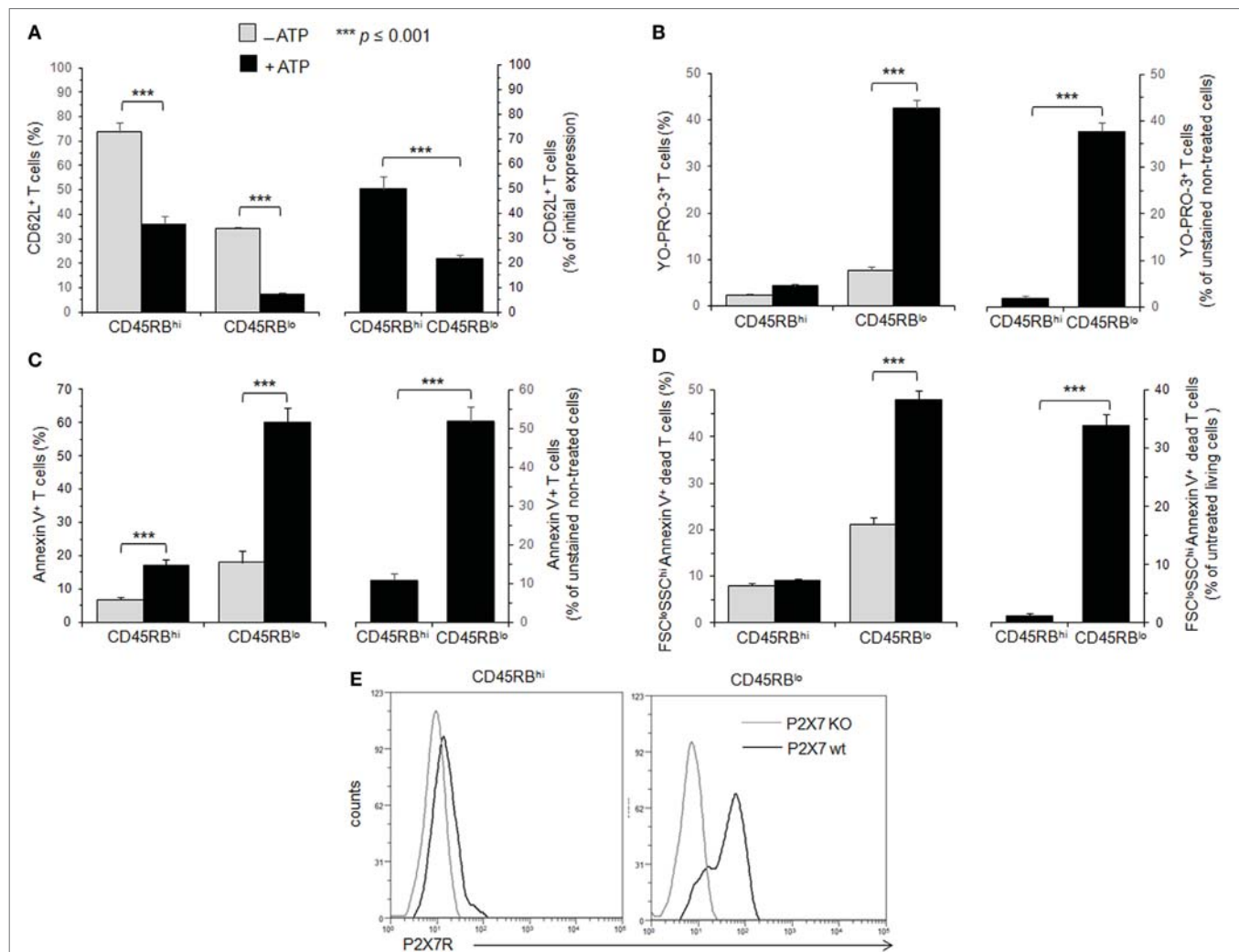


FIGURE 1 | Adenosine-5'-triphosphate (ATP)-mediated cellular activities and P2X7 receptor (P2X7R) membrane expression in T cells with either high or low CD45RB phenotype. **(A–D)** Spleen cells from B6 mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M ATP for 30 min **(A–C)** or 2 h **(D)** in the presence or absence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were subsequently stained with fluorescent monoclonal antibodies (mAbs) against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD45RB, and CD62L as well as Annexin V fluorescent probe. CD62L shedding, pore formation, phosphatidylserine (PS) exposure, or cell death were assessed within the gated CD45RB^{high} (hi) or CD45RB^{low} (lo) CD90⁺CD4⁺B220⁻ T-cell subsets by flow cytometry. Cell morphology (FSC/SSC) and Annexin V staining were used to quantify dead/dying cells (Annexin V⁺ FSC^{lo}SSC^{hi}). Results are expressed as the mean percentage \pm SEM of CD62L⁺ cells **(A)**, YO-PRO-3⁺ cells **(B)**, Annexin V⁺ FSC^{hi}SSC^{hi} living cells **(C)** or FSC^{lo}SSC^{hi} Annexin V⁺ dead cells **(D)** in the presence (■) or absence (□) of ATP (left panels). For each cellular activity, the results are also expressed [(A–D), right panels] as the ratio \pm SEM between the percentages of cells expressing or non expressing cellular activities (A–D) in the presence or absence of ATP, respectively. Data are representative of at least six independent experiments with six to nine mice per group per experiment. Asterisks denote statistically significant differences between the indicated groups (***) $p \leq 0.001$. **(E)** P2X7R membrane expression on CD45RB^{hi} or CD45RB^{lo} CD90⁺CD4⁺B220⁻ T cells from wild-type and P2X7R KO mice was measured using rabbit polyclonal anti-P2X7R antiserum (1:100) and fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies. P2X7R-staining histograms of wild-type T-cell subsets (black histograms) are overlaid on P2X7R-staining histograms of P2X7R KO T-cell subsets (gray histograms). The histograms are representative of six individual mice.

shedding (Figure 1A), pore formation (Figure 1B) and cell death (Figure 1D) than CD45RB^{low} T cells. Altogether, our data suggest that P2X7R-mediated cellular activities are poorly triggered in naive CD45RB^{high} T cells compared to CD45RB^{low} activated T cells.

Membrane P2X7R levels on T cells could be a limiting factor for triggering the various cellular responses induced by ATP, and reduced levels of P2X7R membrane expression could account for the lower sensitivity of CD45RB^{high} naive T cells to ATP. Therefore, we quantified P2X7R on CD45RB^{high} and CD45RB^{low} T cells using a rabbit polyclonal anti-P2X7R serum and flow cytometry. We found that P2X7R is notably less expressed on naive CD45RB^{high} T cells than on activated CD45RB^{low} T cells (Figure 1E), suggesting that (1) ATP-mediated CD62L shedding, pore formation, PS externalization and cell death are triggered in the presence of high levels of P2X7R membrane expression, which are weakly expressed on the surface of naive T cells; (2) T-cell activation upregulates the expression of P2X7R making T cells able to perform all ATP-induced cellular activities.

ATP-Mediated Cellular Activities and P2X7R Membrane Expression in Conventional and Tregs with CD45RB^{low} or CD25⁺ Phenotype

The CD45RB^{low}CD4⁺ T-cell subset encompasses conventional and Tregs (45). Different behaviors of Tconvs and Tregs upon ATP stimulation have been reported previously (35, 36). While one report concluded that Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Tregs were markedly more sensitive to ATP-induced PS exposure and cell death than CD25⁻CD4⁺ Tconvs (35), another reported a similar susceptibility to ATP-induced PS exposure and cell death between CD4⁺ Tconvs and Tregs provided, however, that both T-cell subsets displayed the CD45RB^{low} phenotype (36). In an attempt to clarify these contradictory results, spleen cells from B6.Cg-Foxp3^{tm1Mal}/J (Foxp3GFP) and P2X7R KO mice have been stimulated with ATP for 30 min or 2 h, and the levels of CD62L shedding, PS exposure, pore formation and cell death have been measured in CD4⁺ Tconvs (either CD25⁺ or CD45RB^{low}) and Foxp3⁺CD4⁺ Tregs, which are mostly CD45RB^{low} (Figures 2 and 3).

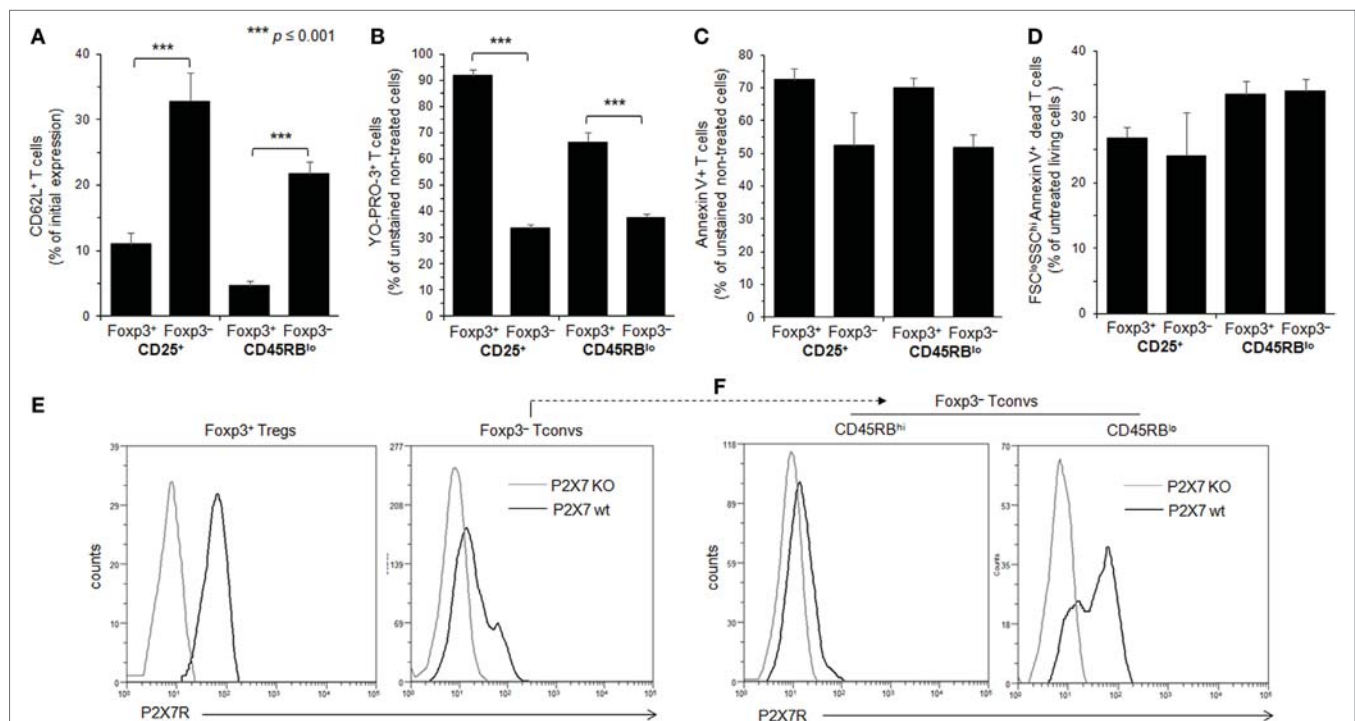


FIGURE 2 | Adenosine-5'-triphosphate (ATP)-mediated cellular activities and P2X7 receptor (P2X7R) membrane expression in regulatory T lymphocytes (Tregs) and conventional T lymphocytes (Tconvs) with CD25⁺ and/or CD45RB^{lo} phenotype. **(A–D)** Spleen cells from Foxp3GFP B6 mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M ATP for 30 min **(A–C)** or 2 h **(D)** in the presence or absence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were subsequently stained with fluorescent monoclonal antibodies against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD45RB, and CD62L as well as Annexin V fluorescent probe. CD62L shedding, pore formation, phosphatidylserine (PS) exposure, or cell death were assessed by flow cytometry on gated GFP⁺ (Foxp3⁺) or GFP⁻ (Foxp3⁻) CD90⁺CD4⁺B220⁻ T cells with CD45RB^{hi}, CD45RB^{lo}, CD25⁺, or CD25⁻ phenotype. Cell morphology (FSC/SSC) and Annexin V staining were used to quantify dead/dying cells (Annexin V⁺ FSC^{ss}SSC^{hi}). Results on CD62L shedding **(A)**, pore formation **(B)**, PS exposure **(C)**, or cell death **(D)** are expressed as the ratio \pm SEM (six mice per group) between the percentage of cells expressing or non expressing cellular activities **(A–D)** in the presence or absence of ATP, respectively. Data are representative of six independent experiments. Asterisks denote statistically significant differences between the indicated groups ($***p \leq 0.001$). **(E, F)** P2X7R membrane expression on CD25⁺ or CD45RB^{low} Foxp3⁺ Tregs, and CD45RB^{hi} or CD45RB^{lo} CD90⁺CD4⁺B220⁻ Tconvs was measured using rabbit polyclonal anti-P2X7R antiserum (1:100) and fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies. P2X7R-staining histograms of wild-type T cells (black histograms) are overlaid on P2X7R-staining histograms of P2X7R KO T cells (gray histograms). The histograms are representative of at least 6 individual mice.

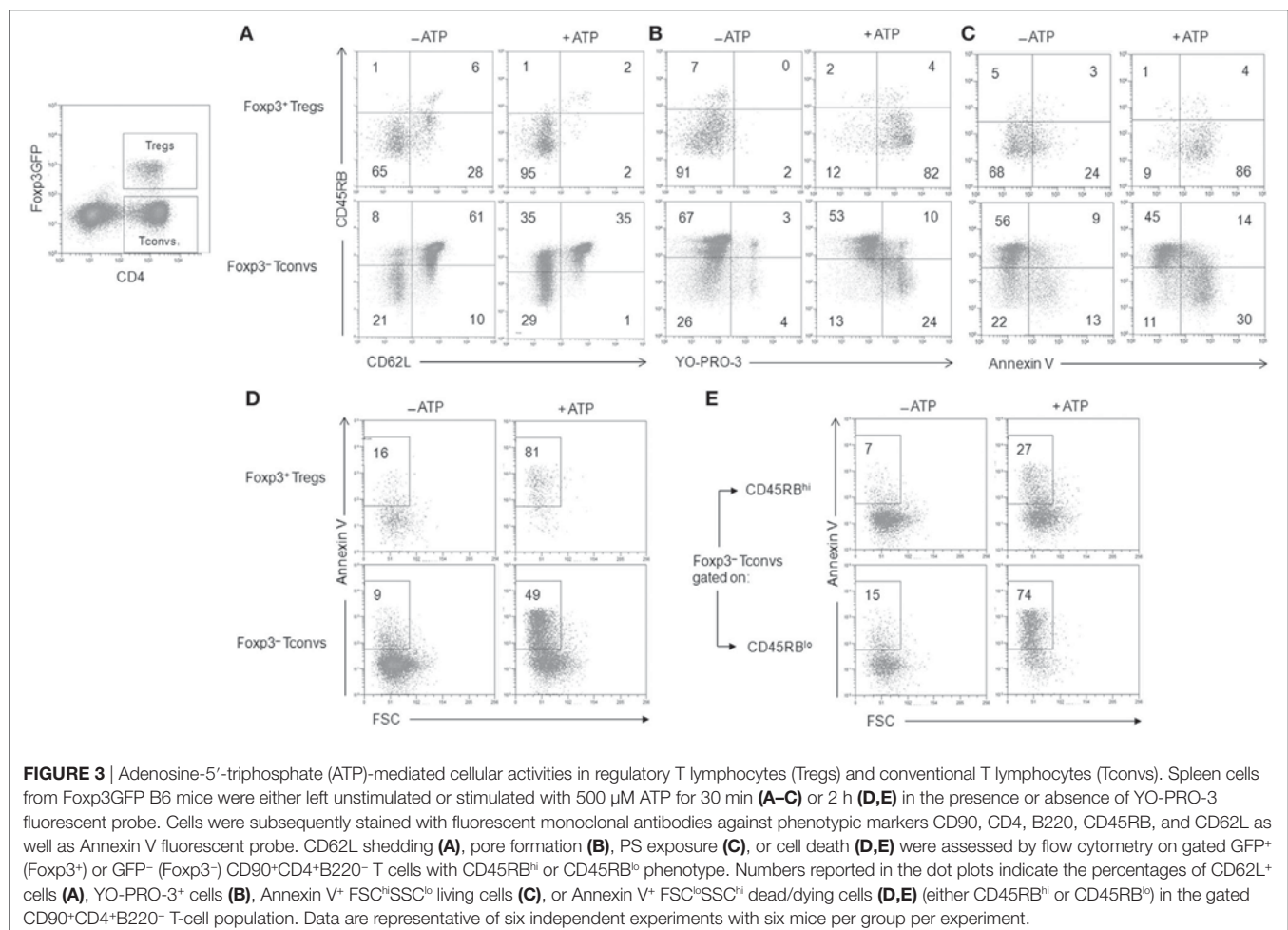
We found that CD25⁺Foxp3⁺ Tregs were three to four times more sensitive to ATP-mediated CD62L shedding (Figure 2A) and pore formation (Figure 2B) than activated CD25⁺Foxp3⁻ Tconvs. However, CD25⁺Foxp3⁻ Tconvs and CD25⁺Foxp3⁺ Tregs displayed similar sensitivity to ATP-mediated PS externalization (Figure 2C) and cell death (Figure 2D). When ATP sensitivity was analyzed in Foxp3⁺ Tregs and Foxp3⁻ Tconvs expressing a CD45RB^{low} phenotype, we found again a greater sensitivity of CD45RB^{low}Foxp3⁺ Tregs to ATP-mediated CD62L shedding (Figures 2A and 3A) and pore formation (Figures 2B and 3B) compared to ATP-treated CD45RB^{low}Foxp3⁻ Tconvs, but not to ATP-mediated PS externalization (Figures 2C and 3C) and cell death (Figures 2D and 3D,E) that was similarly high in CD45RB^{low} Tconvs and CD45RB^{low} Tregs. As expected, CD4⁺ T cells from P2X7R KO mice were totally resistant to ATP-induced cellular activities (data not shown). Altogether our results demonstrate a higher sensitivity of Tregs to P2X7R-mediated cellular activities compared to Tconvs.

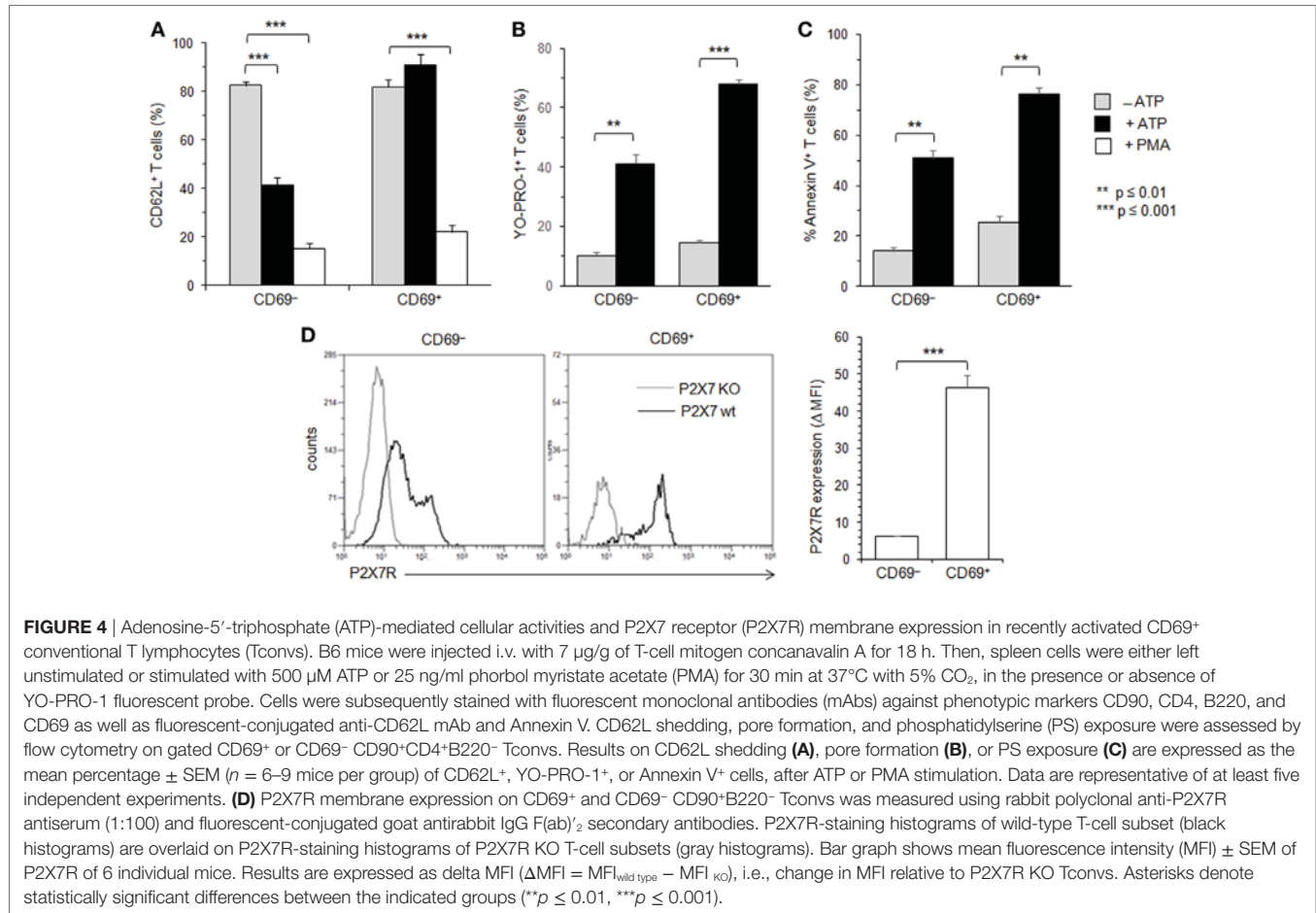
The levels of P2X7R membrane expression are significantly higher on Foxp3⁺ Tregs than on Foxp3⁻ Tconvs (Figure 2E), and especially on CD45RB^{high} naive Tconvs (Figure 2F). Interestingly, and in contrast with Foxp3⁺ Tregs, P2X7R expression on CD45RB^{low} Tconvs is heterogeneous (Figure 2F). This would be

in keeping with the phenotypic and functional heterogeneity of Tconvs and subsequently lead us to analyze the levels of P2X7R membrane expression and functions during their differentiation from naive to memory state.

ATP-Mediated Cellular Activities and P2X7R Membrane Expression in Recently Activated Naive and Memory CD69⁺ T Cells

Figures 1–3 suggest that the cellular activities triggered by ATP correlate positively with the levels of P2X7R membrane expression. Moreover, these expression levels vary among Tconvs according to their state of activation and/or differentiation. Therefore, we have analyzed ATP-induced CD62L shedding, pore formation and PS exposure in B220⁺CD90⁺ Tconvs expressing CD69 (Figure 4), which is the earliest surface marker expressed during T-cell activation. The expression of CD69 marks the activation of naive and memory T cells. CD69 is expressed within < 4 h of activation and peak expression is between 18 and 48 h after stimulation (46). The percentage of T lymphocytes that express CD69 is usually low in the spleen of B6 mice (10.2 ± 2.8%, *n* = 10 mice). Therefore, B6 mice were injected intravenously with 7 µg/g of T-cell mitogen ConA for



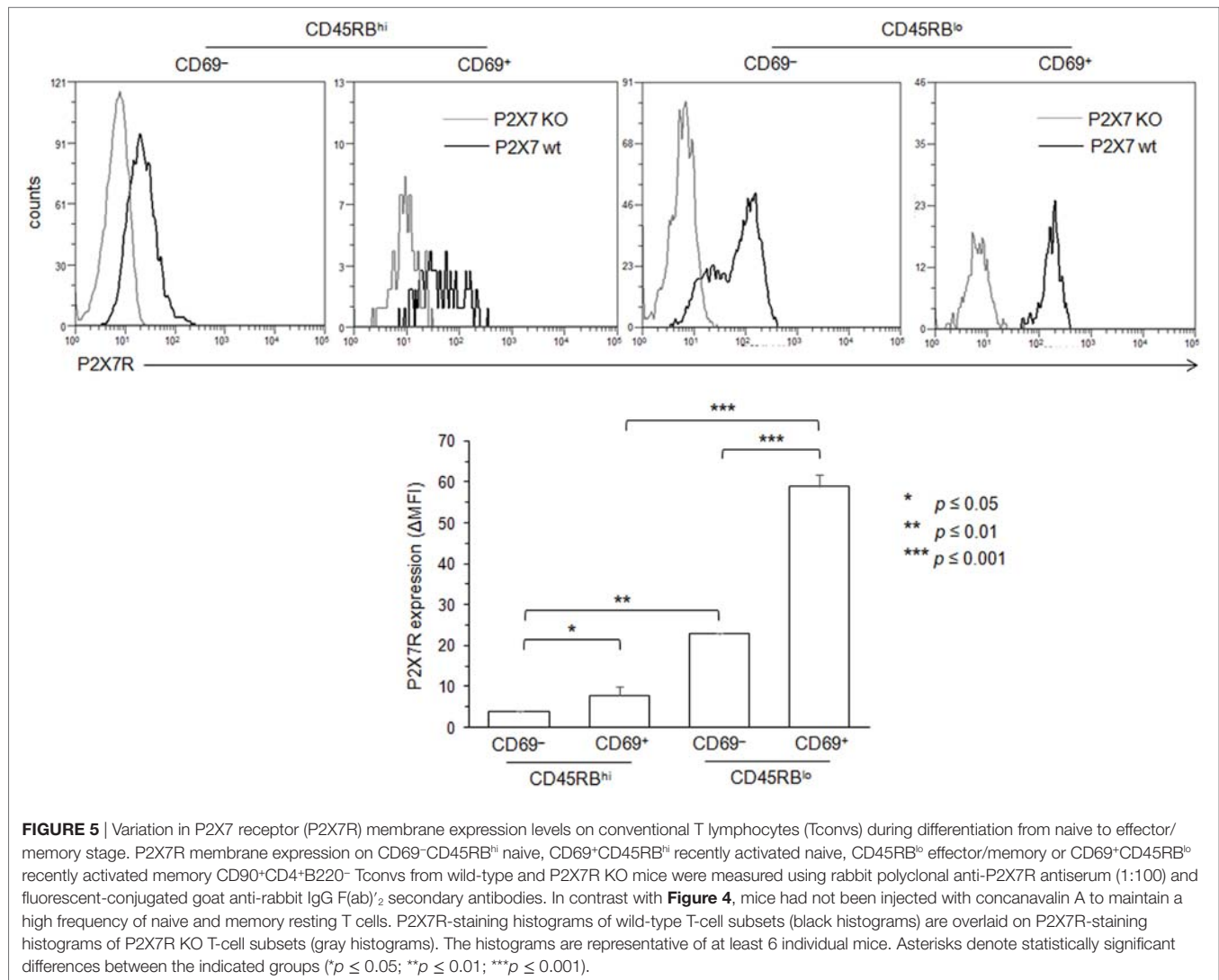


18 h to massively increase the numbers of splenic CD69⁺ T cells ($61 \pm 7.5\%$, *n* = 14 mice) and their mean fluorescence intensity (MFI) (53 vs. 378). In contrast, the ConA treatment had no effect in both spleen cell number and the percentage of splenic T cells (Figure S2 in Supplementary Material). Unexpectedly, we found that CD69⁺ T cells, but not CD69⁻ T cells, failed to cleave their CD62L molecules after ATP treatment, both in terms of the percentages of CD62L⁺ T cells and levels of CD62L membrane expression (Figure 4A, and data not shown). In contrast, CD69⁺ T cells efficiently form pore (Figure 4B) and externalize PS (Figure 4C) after ATP treatment. The inability of recently activated CD69⁺ T cells to shed CD62L molecules was not related to defective proteolytic activity of ADAM-17 since both CD69⁻ and CD69⁺ T cells can shed CD62L after PMA treatment (Figure 4A). The expression of CD69 coincides with a strong upregulation of P2X7R membrane expression (Figure 4D) that is mainly observed on effector/memory CD45RB^{low} T cells (Figure 5).

In summary, recently activated CD69⁺CD45RB^{low} T cells, although expressing high levels of P2X7R, appeared mostly resistant to ATP-induced CD62L cleavage, indicating that P2X7R-mediated cellular activities are not triggered in an all-or-none manner in Tconvs and vary according to their stage of activation.

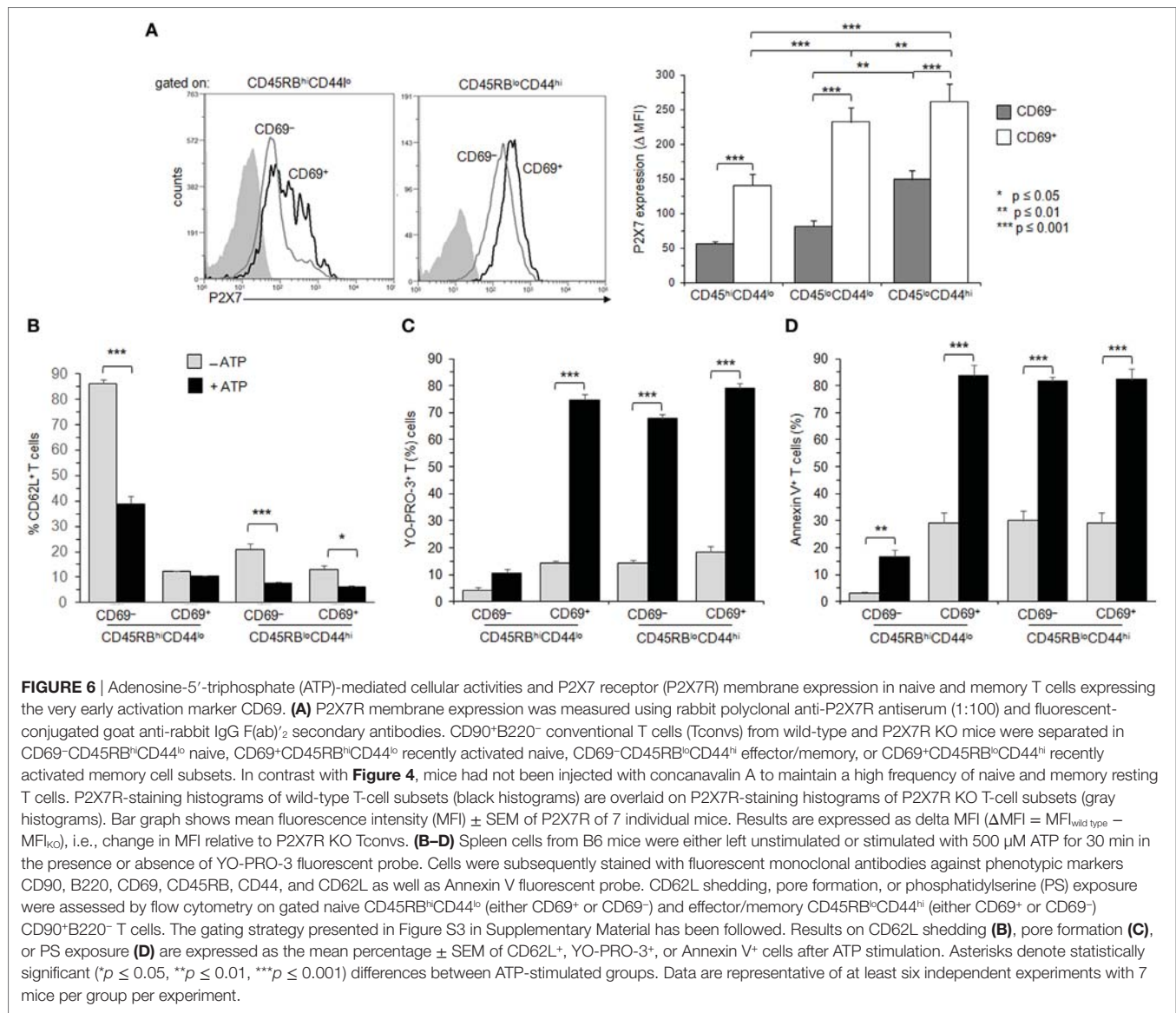
ATP-Mediated Cellular Activities and P2X7R Membrane Expression in Effector/Memory CD45RB^{low}CD44^{high} T Cells

The CD69⁺CD45RB^{low} T-cell subset is heterogeneous and encompasses recently activated naive and memory T cells. Therefore, the membrane expression levels of adhesion molecule CD44, CCR7, CD45RB, CD69, and P2X7R has been used to further explore the sensitivity of naive, recently activated, effector and central memory T cells to ATP in conjunction with the levels of P2X7R membrane expression. CD4⁺ T cells (either CD69⁻ or CD69⁺) with high or low expression levels of CD45RB and CD44 naive and effector/memory markers have been identified and gated using a sequential gating strategy (Figure S3 in Supplementary Material). The differentiation of naive CD45RB^{high}CD44^{low} T cells into effector/memory CD45RB^{low}CD44^{high} T cells is accompanied by a significant increase in P2X7R membrane expression (Figure 6A). A further significant upregulation of P2X7R membrane expression was observed on both naive CD45RB^{high}CD44^{low} and memory CD45RB^{low}CD44^{high} T-cell subsets following the expression of the early activation marker CD69 (Figure 6A). Interestingly, the sensitivity to ATP of naive CD45RB^{high}CD44^{low}, effector memory CD45RB^{low}CD44^{high} (either CCR7⁻ or CCR7⁺) and recently activated CD69⁺ (either naive or memory) T cells was not strictly



correlated with the levels of P2X7R membrane expression especially for ATP-induced CD62L shedding (**Figures 6B–D** and data not shown). ATP-treated naive CD62L^{high}CD45RB^{high}CD44^{low} and effector/memory CD62L^{high}CD45RB^{low}CD44^{high} T cells shed efficiently CD62L (**Figure 6B**). The ability to shed CD62L significantly decreased after the upregulation of activation marker CD69 particularly in naive CD45RB^{high}CD44^{low} T cells (**Figure 6B**). In contrast, naive CD45RB^{high}CD44^{low} T cells had a poor ability to form pore and externalize PS after ATP treatment (**Figures 6C,D**). A marked upregulation of the ability to form pore and externalize PS was observed on naive CD45RB^{high}CD44^{low} T cells following antigenic-activation (CD69⁺), which is retained at the effector/memory stage (**Figures 6C,D**). Because P2X7 displays a low affinity for ATP, we have evaluated whether the resistance to CD62L shedding observed in recently activated naive T cells upon stimulation with 0.5 mM of ATP could be overcome with higher doses of ATP. However, recently activated CD69⁺CD45RB^{high}CD44^{low} T cells did not recover their ability to cleave CD62L after treatment with 1 or 2 mM ATP (data not shown). Finally, we found

that calcium from the extracellular space and/or the intracellular stores was involved in pore formation and PS exposure in Tconvs, but not CD62L shedding, since they were significantly reduced in the presence of extracellular (EGTA) and/or intracellular (BAPTA-AM) calcium chelator (**Figure 7A**). As expected, pretreatment of spleen cells with P2X7R antagonist KN-62 inhibited ATP-induced cellular responses (**Figure 7A**). Likewise, all T-cell subsets from P2X7R KO mice were resistant to 0.5–2 mM ATP stimulation, as shown by a complete lack of CD62L shedding, pore formation and PS exposure (Figure S4B in Supplementary Material). As observed in CD69⁺ T cells (**Figure 4A**), ADAM-17 metalloproteases were not defective in ATP-treated central memory CD62L^{high}CD45RB^{low}CD44^{high} T cells since PMA treatment was able to induce the cleavage of CD62L. Moreover, the shedding of CD62L induced by ATP in naive CD45RB^{high}CD44^{low} T cells or by PMA in effector/memory CD45RB^{low}CD44^{high} T cells could be prevented by the metalloprotease inhibitor GM6001, in a similar dose dependent-manner (Figure S4A in Supplementary Material), confirming the specificity of CD62L cleavage.



To summarize, despite high levels of P2X7R membrane expression, CD45RB^{low}CD44^{high} T cells, especially upon activation (CD69⁺), are strongly resistant to ATP-induced CD62L cleavage, but not pore formation and PS exposure, demonstrating that P2X7R-mediated cellular activities vary during their activation and differentiation into effector or central memory Tconvs, independently of the levels of P2X7R membrane expression.

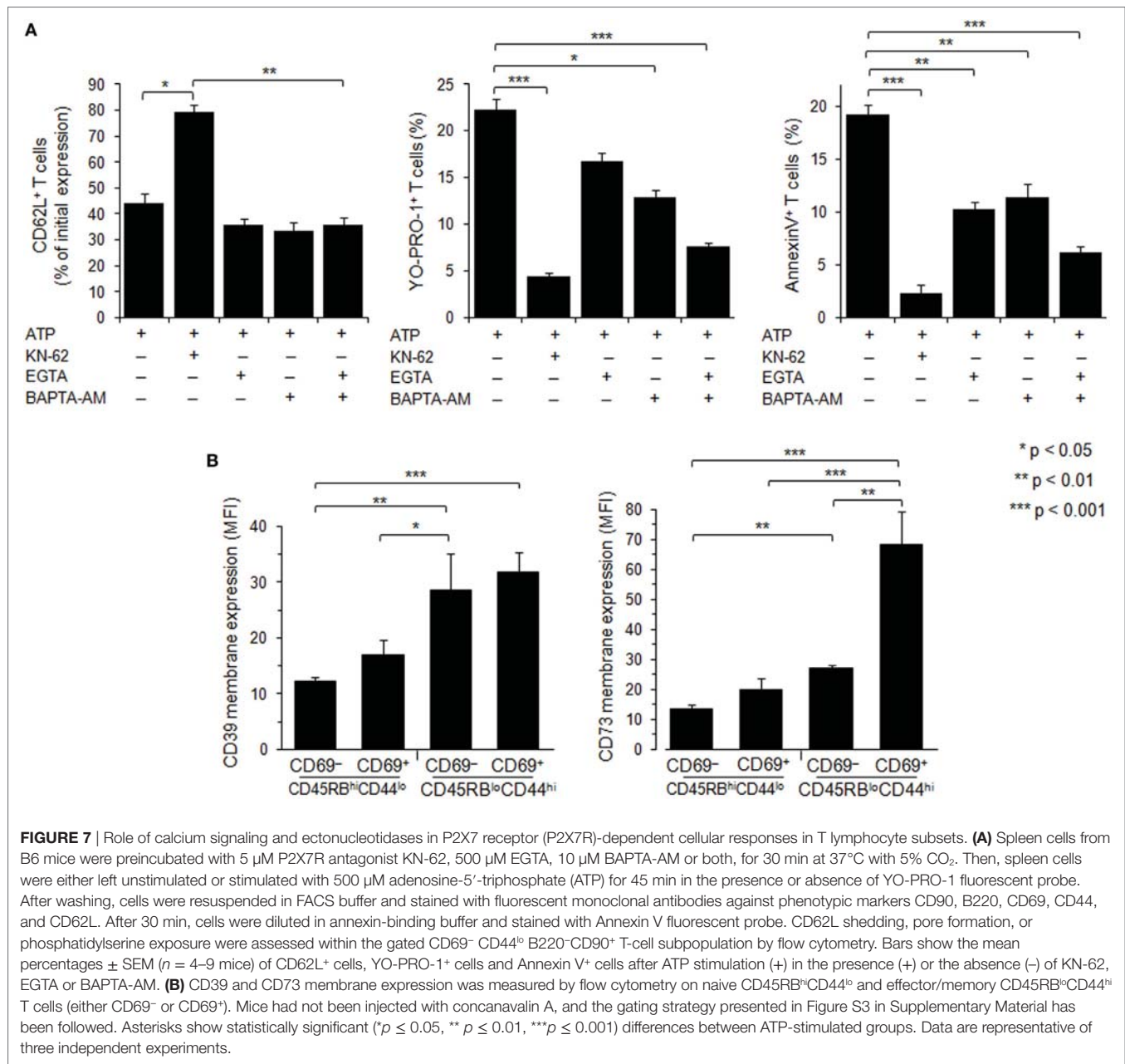
CD39 and CD73 Membrane Expression on Naive, Recently Activated and Effector/Memory T Cells

Ectoenzymes CD39 and CD73 sequentially degrade extracellular ATP to adenosine. To examine whether the variation of P2X7R-mediated cellular responses of Tconvs might be due to enhanced hydrolysis of ATP following CD39 and/or CD73 overexpression, we have analyzed the levels of CD39 and CD73

membrane expression in Tconvs according to their state of activation and differentiation. Flow cytometry analyses show that the levels of CD39 and CD73 membrane expression increase with T-cell differentiation from naive CD45RB^{high}CD44^{low} to effector/memory CD45RB^{low}CD44^{high} stage (**Figure 7B**). Interestingly, the expression of the early activation marker CD69 by memory CD45RB^{low}CD44^{high} Tconvs is accompanied by a strong upregulation of CD73 (**Figure 7B**). However, Tconvs strongly expressing ectonucleotidases also present higher levels of ATP-induced pore formation and PS externalization. Thus, it is likely that these ectonucleotidases do not control P2X7-mediated cellular responses in Tconvs.

DISCUSSION

Although the ATP/P2X7R pathway is recognized as an important regulator of T cell functions (27–30), the respective sensitivities



of Tregs and Tconvs to extracellular ATP are discussed and this point needs further clarification. In one report Tregs appeared to be markedly more sensitive to ATP than Tconvs, whereas in another, Tregs and Tconvs displayed similar high sensitivity to ATP provided that both T-cell populations expressed low levels of membrane phosphatase CD45RB (35, 36). However, given the large cellular and functional heterogeneity of the CD45RB^{low} Tconv population, no definitive conclusion can be drawn from these previous studies regarding the sensitivity of Tconvs to ATP. Thus, we have previously reported that effector CD45RB^{low} T cells become totally resistant to ATP at the preapoptotic stage (38). The sensitivity of T cells to ATP has also been correlated with P2X7R mRNA or protein expression levels (29, 33, 47). However,

these studies were conducted in whole T-cell populations and not in T-cell subsets, which could express different levels of P2X7R depending on the stage of activation. Several reports reviewed in Ref. (48) do not show a strong correlation between mRNA expression levels and protein abundance, weakening previous conclusions on the relationship between P2X7R mRNA levels and ATP-induced cellular functions. Previous studies on the quantification of P2X7R protein expression have used Western blotting in whole-cell lysates from splenic T cells (29), which does not allow to discriminate between cell surface and intracellular P2X7R. Indeed, we have reported that P2X7R can accumulate in the cytosol of a T-cell subset without cell surface detection of P2X7R (38). Therefore, our present study aims to gain a clearer

picture on the sensitivity of the major subsets of T cells to extracellular ATP in relation with the levels of P2X7R membrane expression on each subset. Through four different cellular activities (CD62L shedding, pore formation, PS externalization, cell death) triggered following the stimulation of P2X7R, we have (1) compared the sensitivity of Tconvs and Foxp3⁺ Tregs to ATP; (2) evaluated the ATP sensitivity of Tconvs at different stages of activation and differentiation; (3) quantified P2X7R membrane expression on Tconvs at different stage of activation and differentiation. In agreement with previous data (36, 37), we found that activated CD45RB^{low} Tconvs displayed significant higher sensitivity to ATP-induced PS externalization and cell death than naive CD45RB^{high} Tconvs. Moreover, we found that activated CD45RB^{low} Tconvs also displayed significant higher sensitivity to ATP-induced CD62L shedding and pore formation than naive CD45RB^{high} Tconvs (**Table 1**). In contrast with previous report (36), we do not find that CD45RB^{low}Foxp3⁺ Tregs display higher sensitivity to ATP-induced cell death and PS externalization than activated CD45RB^{low}Foxp3⁻ Tconvs (**Table 1**), but rather show significant higher sensitivity to ATP-induced CD62L shedding and pore formation. We suggest that the anti-CD45RB mAb used to control CD45RB expression levels in Tregs and Tconvs (36) could account for the discrepancy between this report and our present data. Indeed, we show that this mAb recognizes an epitope shared by both CD45RB and B220 molecules, suggesting that Taylor et al. (36) assessed P2X7R activity in a pool of B220⁺ and CD45RB^{high} Tconvs. Moreover, we had reported that B220-expressing effector Tconvs were totally refractory to ATP stimulation (38). Thus, in our present experiments, P2X7R-induced cellular activities were analyzed in B220-negative gated T cells. The difference in ligands used to activate P2X7R might also explain the discrepancy observed between previous studies (36) and our present data. Indeed, it has been reported that BzATP triggers pore formation in lymphocytes with an EC₅₀ value of about 15 μM compared to 85 μM for ATP. Thus, BzATP stimulates P2X7-induced pore formation up to 30% more than ATP (49). In all our experiments, splenocytes have been activated with the physiological agonist ATP instead of BzATP, to avoid an overstimulation of P2X7R-mediated cellular responses that could have masked potential differences between T-cell subsets.

Interestingly, we show that P2X7R-mediated cellular activities in Tconvs are not triggered in an all-or-none manner and their expressions depend on the stage of activation and differentiation.

Thus, among the activated T-cell subsets, we found that recently activated CD69⁺ T cells showed a significant reduction in their ability to shed CD62L in the presence of ATP despite significant higher levels of P2X7R expression than CD69⁻ T cells. In contrast, CD69⁺ T cells display significantly higher efficiency to form pore and externalize PS than CD69-negative T cells. CD69 expression marks the activation of both naive (CD44^{low}) and memory (CD44^{high}) T cells. Therefore, using a more detailed phenotypic characterization of Tconvs, we have compared the levels of P2X7R membrane expression and sensitivity to ATP of naive (CCR7⁺CD45RB^{high}CD44^{low}) and effector/memory (CD45RB^{low}CD44^{high} either CCR7⁺ or CCR7⁻), a recently activated (CD69⁺) (naive or memory) Tconvs. Naive CD62L^{high}CD45RB^{high}CD44^{low} Tconvs had a notably higher ability to shed CD62L in the presence of ATP than lymphoid-homing central memory CD62L^{high}CCR7⁺CD44^{high} T cells, thus suggesting that P2X7R does not play a central role in the shedding of homing-receptor CD62L at least during secondary immune responses. Antigenic stimulation of naive CD45RB^{high}CD44^{low} Tconvs, as evidenced by the upregulation of CD69, leads to both decreased ability to shed CD62L and increased ability to form pore (**Table 1**). CD62L regulates the homing of naive and central memory T cells to secondary lymphoid organs whereas sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1PR1) controls T cell egress from these organs. CD62L is shed from the plasma membrane of T cells following activation. The S1PR1 ligand, S1P, is expressed at low concentration in lymphoid organs and at high concentration in circulatory fluids. The S1P gradient promotes S1PR1-dependent migration of T cells from secondary lymphoid organs into the blood and lymphatic circulation. CD69 expressed on recently activated T cells causes internalization and degradation of S1PR1, delaying T cell egress (50). The shedding of CD62L on activated T cells prevents their reentry into lymph nodes, and favors the acquisition of T-cell effector functions. It is a slow process that reaches its maximum 4–6 h postactivation (51). The reduced capacity of recently activated CD69⁺ naive T cells to shed CD62L following autocrine activation of P2X7R could amplify the transient retention of recently activated T cells in the lymph nodes caused by the CD69-mediated inhibition of S1PR1, favoring a full differentiation of activated T cells into effector cells. Moreover, the higher capacity of recently activated CD69⁺ naive T cells to form pore compared to CD69⁻ naive T cells could participate to their full activation by increasing calcium entry through P2X7R acting as a costimulatory factor involved in the strength of T cell

TABLE 1 | Summary of P2X7R membrane expression and ATP-mediated cellular activities in Tconvs and Tregs.

	Tregs ^a		Tconvs ^a		
	CD45RB ^{lo} Foxp3 ⁺	Naive CD45RB ^{hi} CD44 ^{lo}	Activated naive CD69 ⁺ CD45RB ^{hi} CD44 ^{lo}	Effector/Memory CD69 ⁻ CD45RB ^{lo} CD44 ^{hi}	Activated memory CD69 ⁺ CD45RB ^{lo} CD44 ^{hi}
CD62L shedding	++++	+++	-/+	+++	+
Pore formation	++++	-/+	+++	+++	+++
PS externalization	++++	++	+++	+++	+++
Cell death ^b	++++		-/+		+++
P2X7R expression	++++	+	++	+++	++++

^aTreated with 0.5 mM ATP.

+: low level; ++: moderate level; +++: high level; ++++: very high level.

^bCell death was determined in **Figure 1** (panel D) on whole CD45RB^{low} and CD45RB^{high} Tconvs in the absence of CD69 and CD44 phenotyping.

activation. Although it has been suggested that extracellular calcium is not a critical factor in pore formation (52), we found that calcium from the extracellular space and/or the intracellular stores was involved in pore formation and PS exposure in Tconvs, but not CD62L shedding. This finding agrees with our previous report showing that P2X7R-induced amyloid precursor protein shedding is independent of extracellular calcium (26). Because pore formation induces robust extracellular calcium influx (53), our data emphasize the role of P2X7R in the regulation of early signaling events involved in T-cell activation, as previously reported (27, 28, 30).

The expression of P2X7R splice variants (12, 13, 54) could account for the dissociation of ATP-induced cell activities observed during activation and differentiation of Tconvs. However, the analysis of the P2X7a and P2X7k splice variants by real time RT-PCR have shown that the Tconvs express the P2X7k variant whatever their stage of activation/differentiation (unpublished data). Membrane-bound ATPases play an important role in the regulation of cell sensitivity to ATP by regulating the extracellular concentration of ATP. Thus, ectoenzymes CD39 and CD73 sequentially hydrolyze ATP into ADP, AMP, and adenosine. However, the dissociation in ATP-induced cell activities that we observed in Tconvs is probably not linked to the levels of ATPase membrane expression. Indeed B220⁺ Tconvs, which express low levels of CD39, are totally resistant to ATP stimulation (23). Moreover, we show herein that the levels of CD39 and CD73 membrane expression increase in parallel with those of P2X7R and maximum levels of ectonucleotidases upregulation are reached on Tconvs displaying the higher levels of ATP-induced pore formation and PS externalization. Likewise, although Tregs express high levels of membrane ectonucleotidases CD39 and CD73 (55), they are highly sensitive to ATP-induced cellular functions (Table 1). The ability of Tregs to form high levels of P2X7 membrane pore might favor their regulatory functions by increasing the amount of ATP molecules released in the pericellular space, and their subsequent hydrolysis to the adenosine immunosuppressive molecule by CD39 and CD73 (55).

To summarize, CD45RB^{low} or CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs show high levels of P2X7R membrane expression and sensitivity to ATP. In contrast, P2X7R-mediated cellular activities in CD4⁺ Tconvs are not dependent on the levels of P2X7R membrane expression and not triggered in an all-or-none manner, and depend on their stage of activation/differentiation. Thus, the P2X7R surface expression on CD4⁺ Tconvs is in the following order: CD45RB^{hi}CD44^{lo} cells < CD45RB^{lo}CD44^{lo} < CD45RB^{lo}CD44^{hi} cells. In each of the three subsets, CD69⁺ recently activated T cells express very significantly more P2X7R than their CD69⁻ counterpart. However, the naive CD69⁻CD45RB^{hi}CD44^{lo} T cells bearing the lowest surface P2X7R yield the highest CD62L shedding response but give a weak PS exposure response and do not have a significant pore formation. Recently activated CD69⁺ naive CD45RB^{hi}CD44^{lo} Tconvs show a significant reduction in their ability to proteolytically cleave CD62L compared to inexperienced naive CD69⁻ T cells. The reverse situation is observed for ATP-induced pore formation, and to a lesser extent for PS externalization, which are significantly upregulated in recently activated naive CD69⁺ Tconvs compared to naive CD69⁻CD45RB^{hi}CD44^{lo} Tconvs. Effector/memory

CD69⁻CD45RB^{lo}CD44^{hi} T cells show high levels of P2X7R membrane expression and sensitivity to ATP. Recently activated CD69⁺ effector/memory CD45RB^{lo}CD44^{hi} T lymphocytes with the highest amounts of surface P2X7R respond strongly to ATP by PS exposure and pore formation but yield weaker CD62L shedding compared to their CD69⁻ counterpart.

ETHICS STATEMENT

All the experiments were conducted in accordance with French (décret no. 2013-118) and EU (directive 86/609/EEC) guidelines for the care of laboratory animals and approved by our local research ethics committee (CEEA 59).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PB, HS, AM, and JL conceived and designed the experiments. HS, AM, JL, SL, and MB performed the experiments. PB, HS, AM, JL, SL, and JK analyzed and interpreted the data. PB and HS wrote the manuscript with the assistance of all authors. JK and CK-L critically reviewed the manuscript.

FUNDING

This work was funded by grants from ANR—Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0089-02 and ANR-13-ISV6-0003). Hanaa Safya was the recipient of a National Council for Scientific Research (CNRS) Lebanon fellowship.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00360/full#supplementary-material>.

FIGURE S1 | Anti-CD45RB antibodies do not distinguish CD45RB from CD45RABC (B220) isoforms. COS-7 fibroblasts were transfected with a pCDEF3 expression vector containing CD45RABC (B220) cDNA. 48 h later, transfected cells were stained with FITC-conjugated anti-CD45RA, PE-conjugated anti-CD45RB, APC-conjugated anti-CD45RC, and PE Cy5.5-conjugated anti-CD45RABC or isotype controls, and analyzed by flow cytometry. **(A)** R1 and R2 gates delineate B220-negative and B220⁺ COS-7 cells, respectively. **(B)** Expression of CD45RA, CD45RB or CD45RC in COS-7 cells gated on R2. Flow cytometry histograms obtained with anti-CD45RA, anti-CD45RB or anti-CD45RC monoclonal antibody (—) are overlaid on histograms obtained with isotype controls (- - -). At least 20,000 events were analyzed from each sample. Data are representative of three independent experiments.

FIGURE S2 | Massive increase of CD69 expression on splenic T cells from concanavalin A (ConA)-treated mice. B6 mice were injected i.v. with 7 µg/g of T-cell mitogen ConA or phosphate-buffered saline. They were euthanized 18 h after injection, spleen cells were counted and stained with fluorescent monoclonal antibodies against phenotypic markers CD90, B220, CD4, and CD69 or isotype controls, and analyzed by flow cytometry. At least 20,000 events were analyzed from each sample. Asterisks indicate statistically significant differences between groups (***p* ≤ 0.001).

FIGURE S3 | Representative dot plots and histograms showing sequential gating for analyses of CD62L expression levels on CD45RB^{hi}CD44^{lo} naive and CD45RB^{lo}CD44^{hi} effector/memory CD4⁺ T cells (either CD69⁻ or CD69⁺). Spleen cells from B6 mice were stained with either fluorescent monoclonal antibodies against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD45RB, CD44, CD62L, and CD69 or isotype controls, and analyzed by flow cytometry. Mice had not been

injected with concanavalin A to maintain a high frequency of naive and memory resting T cells. FSC vs. SSC dot plots were used to select single, viable cells and exclude debris, dead cells and doublets. CD90 vs. B220 dot plot was used to select B220⁺CD90⁺ T cells in the FSC⁺SSC⁺-gated cell population (Gate 1) and exclude B220⁺CD90⁻ T cells. The CD90⁺B220⁻ T cells were then further gated by the expression of CD4 (Gate 2). The relative expression of CD45RB and CD44 was analyzed on the CD4⁺ T-cell subset to identify CD45RB^{hi}CD44^{lo} naive cells (Gate 3) and CD45RB^{lo}CD44^{hi} effector/memory cells (Gate 4). Naive and memory/effector CD4⁺ T cells were then identified by the expression of CD69. Finally, the percentages of T cells expressing CD62L were gated on CD69⁻ (Gate 5) and CD69⁺ (Gate 6) cells. At least 20,000 events were analyzed from each sample.

FIGURE S4 | Inhibition of CD62L shedding by metalloprotease inhibitor and absence of P2X7R signaling in P2X7KO mice. **(A)** Spleen cells from B6 mice ($n = 6$ mice/group) were preincubated with 0, 10, 25, 50, 100 μ M of metalloprotease inhibitor GM6001 for 15 min at 37°C, and then either left

unstimulated or stimulated with 2 mM adenosine-5'-triphosphate (ATP) for 30 min at 37°C. Cells were subsequently stained with monoclonal antibody (mAb) against CD62L and phenotypic markers. Cell surface expression of CD62L was assessed by flow cytometry in the gated CD90⁺, CD45RB^{hi}CD44^{lo} naive, and CD45RB^{lo}CD44^{hi} effector/memory CD4⁺ T cells. Bars represent the percentages of initial CD62L surface expression after ATP stimulation in the presence or absence of metalloprotease inhibitor. **(B)** Spleen cells from B6 and P2X7KO mice were either left unstimulated or stimulated with 2 mM ATP for 30 min in the presence or absence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were subsequently stained with fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD45RB, CD44, and CD62L as well as Annexin V fluorescent probe. CD62L shedding, pore formation or phosphatidylserine exposure were assessed within the gated CD45RB^{hi}CD44^{lo} T-cell subset by flow cytometry. Flow cytometry histograms display the staining of spleen cells from B6 or P2X7RKO mice with anti-CD62L antibody, YO-PRO-3, or Annexin V probe, left unstimulated (black line) or following ATP stimulation (gray line). Numbers inside each panel correspond to relevant cell percentages in unstimulated/stimulated conditions.

REFERENCES

- Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity* (2017) 47(1):15–31. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020
- Burnstock G, Knight GE. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal* (2017). doi:10.1007/s11302-017-9593-0
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* (2002) 168(12):6436–45. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6436
- Chen L, Brosnan CF. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* (2006) 176(5):3115–26. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3115
- Wiley JS, Chen R, Wiley MJ, Jamieson GP. The ATP4-receptor-operated ion channel of human lymphocytes: inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by extracellular sodium ions. *Arch Biochem Biophys* (1992) 292(2):411–8. doi:10.1016/0003-9861(92)90010-T
- Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem* (2005) 280(40):33968–76. doi:10.1074/jbc.M502705200
- Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RD, Perfettini JL, Neto AC, Kanellopoulos JM, et al. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* (1999) 276(5 Pt 1):C1139–47. doi:10.1152/ajpcell.1999.276.5.C1139
- Ferrari D, Los M, Bauer MK, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* (1999) 447(1):71–5. doi:10.1016/S0014-5793(99)00270-7
- Humphreys BD, Rice J, Kertesz SB, Dubyak GR. Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem* (2000) 275(35):26792–8. doi:10.1074/jbc.M002770200
- Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* (2005) 280(30):28142–51. doi:10.1074/jbc.M501290200
- Jun DJ, Kim J, Jung SY, Song R, Noh JH, Park YS, et al. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* (2007) 282(52):37350–8. doi:10.1074/jbc.M707915200
- Adinolfi E, Callegari MG, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, Cavagna D, et al. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* (2009) 284(15):10120–8. doi:10.1074/jbc.M805805200
- Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* (2010) 24(9):3393–404. doi:10.1096/fj.09-153601
- Colomar A, Marty V, Medina C, Combe C, Parnet P, Amedee T. Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J Biol Chem* (2003) 278(33):30732–40. doi:10.1074/jbc.M304534200
- Kahlenberg JM, Dubyak GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* (2004) 286(5):C1100–8. doi:10.1152/ajpcell.00494.2003
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* (2001) 276(1):125–32. doi:10.1074/jbc.M006781200
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* (2006) 176(7):3877–83. doi:10.4049/jimmunol.176.7.3877
- Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* (2007) 28(9):465–72. doi:10.1016/j.tips.2007.07.002
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* (2010) 330(6002):362–6. doi:10.1126/science.1195491
- Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* (1997) 7(3):433–44. doi:10.1016/S1074-7613(00)80364-7
- Coutinho-Silva R, Stahl L, Raymond MN, Jungas T, Verbeke P, Burnstock G, et al. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* (2003) 19(3):403–12. doi:10.1016/S1074-7613(03)00235-8
- Gu B, Bendall LJ, Wiley JS. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* (1998) 92(3):946–51.
- Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, et al. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* (2009) 20(6):1785–94. doi:10.1091/mbc.E08-11-1135
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* (2004) 24(1):1–7. doi:10.1523/JNEUROSCI.3792-03.2004
- Garbers C, Janner N, Chalaris A, Moss ML, Floss DM, Meyer D, et al. Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J Biol Chem* (2011) 286(17):14804–11. doi:10.1074/jbc.M111.229393
- Delarasse C, Auger R, Gonnord P, Fontaine B, Kanellopoulos JM. The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* (2011) 286:2596–606. doi:10.1074/jbc.M110.200618
- Loomis WH, Namiki S, Ostrom RS, Insel PA, Junger WG. Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* (2003) 278(7):4590–6. doi:10.1074/jbc.M207868200

28. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* (2008) 1(39):ra6. doi:10.1126/scisignal.1160583/39/ra6
29. Tsukimoto M, Tokunaga A, Harada H, Kojima S. Blockade of murine T cell activation by antagonists of P2Y6 and P2X7 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 384(4):512–8. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.011
30. Yip L, Woehrlle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* (2009) 23(6):1685–93. doi:10.1096/fj.08-126458
31. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* (2008) 455(7214):808–12. doi:10.1038/nature07240
32. Purvis HA, Anderson AE, Young DA, Isaacs JD, Hilkens CM. A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *J Immunol* (2014) 193(3):1142–50. doi:10.4049/jimmunol.1302467
33. Schenk U, Frascoli M, Proietti M, Geffers R, Traggiai E, Buer J, et al. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* (2011) 4(162):ra12. doi:10.1126/scisignal.2001270
34. Heiss K, Janner N, Mahns B, Schumacher V, Koch-Nolte F, Haag F, et al. High sensitivity of intestinal CD8+ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses. *J Immunol* (2008) 181(6):3861–9. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3861
35. Aswad F, Kawamura H, Dennert G. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* (2005) 175(5):3075–83. doi:10.4049/jimmunol.175.5.3075
36. Taylor SR, Alexander DR, Cooper JC, Higgins CF, Elliott JI. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J Immunol* (2007) 178(6):3474–82. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3474
37. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, et al. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol* (2005) 7(8):808–16. doi:10.1038/ncb1279
38. Le Gall SM, Legrand J, Benbijja M, Safya H, Benihoud K, Kanellopoulos JM, et al. Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* (2012) 7(12):e52161. doi:10.1371/journal.pone.0052161/PONE-D-12-13729
39. Renno T, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR. Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* (1996) 183(2):431–7. doi:10.1084/jem.183.2.431
40. Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR. Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* (1998) 28(2):540–7. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<540::AID-IMMU540>3.0.CO;2-Y
41. Bleesing JJ, Morrow MR, Uzel G, Fleisher TA. Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* (2001) 213(1):72–81. doi:10.1006/cimm.2001.1865
42. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* (2003) 21:107–37. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946
43. Wang Y, Kissenpennig A, Mingueneau M, Richelme S, Perrin P, Chevrier S, et al. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* (2008) 180(3):1565–75. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1565
44. McNeill L, Cassady RL, Sarkardei S, Cooper JC, Morgan G, Alexander DR. CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol Lett* (2004) 92(1–2):125–34. doi:10.1016/j.imlet.2003.10.018
45. Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* (1994) 179(2):589–600. doi:10.1084/jem.179.2.589
46. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* (2005) 26(3):136–40. doi:10.1016/j.it.2004.12.006
47. Aswad F, Dennert G. P2X7 receptor expression levels determine lethal effects of a purine based danger signal in T lymphocytes. *Cell Immunol* (2006) 243(1):58–65. doi:10.1016/j.cellimm.2006.12.003
48. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* (2012) 13(4):227–32. doi:10.1038/nrg3185
49. Gargett CE, Cornish JE, Wiley JS. ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* (1997) 122(5):911–7. doi:10.1038/sj.bjpp.0701447
50. Bankovich AJ, Shioh LR, Cyster JG. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem* (2010) 285(29):22328–37. doi:10.1074/jbc.M110.123299
51. Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One* (2011) 6(7):e22560. doi:10.1371/journal.pone.0022560
52. Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* (2007) 581(3):483–8. doi:10.1016/j.febslet.2006.12.056
53. Luo J, Lee S, Wu D, Yeh J, Ellamushi H, Wheeler AP, et al. P2X7 purinoceptors contribute to the death of Schwann cells transplanted into the spinal cord. *Cell Death Dis* (2013) 4:e829. doi:10.1038/cddis.2013.343
54. Nicke A, Kuan Y-H, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, et al. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* (2009) 284(38):25813–22. doi:10.1074/jbc.M109.033134
55. 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(6):1257–65. doi:10.1084/jem.20062512

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Safya, Mellouk, Legrand, Le Gall, Benbijja, Kanellopoulos-Langevin, Kanellopoulos and Bobé. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

.1.2 Figures supplémentaires

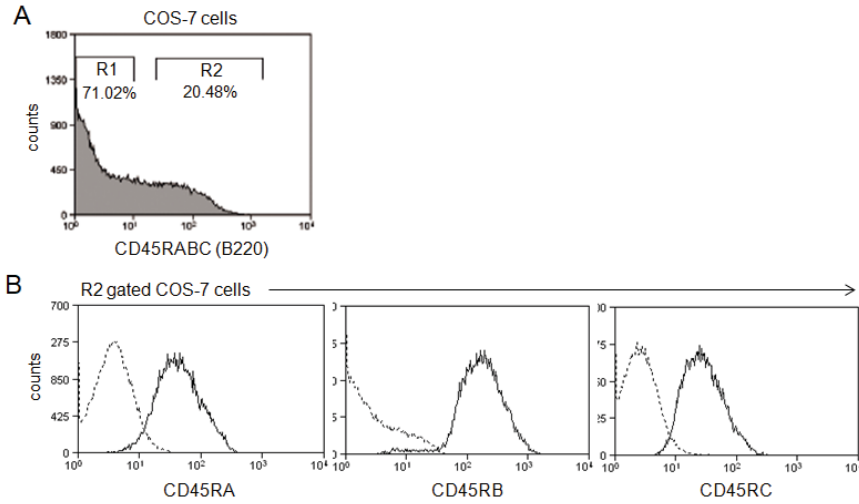


Figure 1S

Figure S1 : Anti-CD45RB antibodies do not distinguish CD45RB from CD45RABC (B220) isoforms. COS-7 fibroblasts were transfected with a pCDEF3 expression vector containing CD45RABC (B220) cDNA. 48 h later, transfected cells were stained with FITC-conjugated anti-CD45RA, PE-conjugated anti-CD45RB, APC-conjugated anti-CD45RC, and PE Cy5.5-conjugated anti-CD45RABC or isotype controls, and analyzed by flow cytometry. **(A)** R1 and R2 gates delineate B220-negative and B220⁺ COS-7 cells, respectively. **(B)** Expression of CD45RA, CD45RB or CD45RC in COS-7 cells gated on R2. Flow cytometry histograms obtained with anti-CD45RA, anti-CD45RB or anti-CD45RC monoclonal antibody (—) are overlaid on histograms obtained with isotype controls (- - -). At least 20,000 events were analyzed from each sample. Data are representative of three independent experiments.

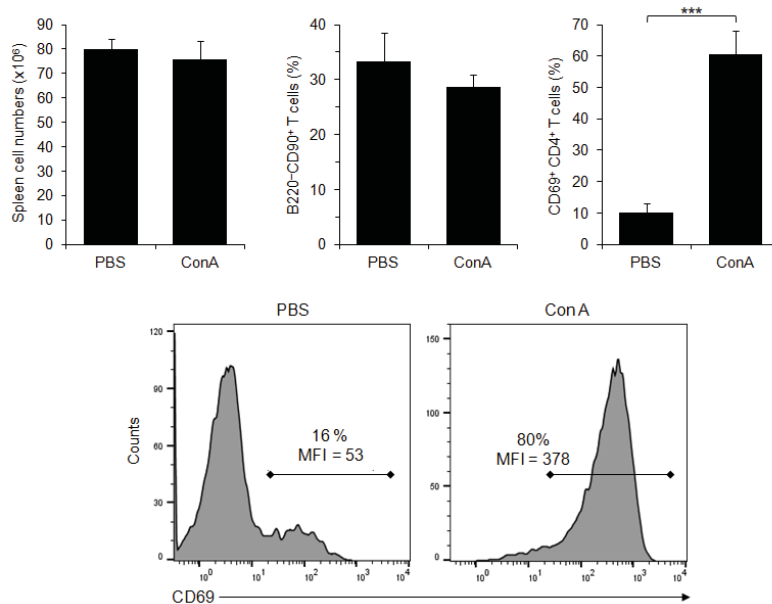


Figure 2S

Figure S2 : Massive increase of CD69 expression on splenic T cells from concanavalin A (ConA)-treated mice. B6 mice were injected i.v. with 7 μ g/g of T-cell mitogen ConA or phosphate-buffered saline. They were euthanized 18 h after

injection, spleen cells were counted and stained with fluorescent monoclonal antibodies against phenotypic markers CD90, B220, CD4, and CD69 or isotype controls, and analyzed by flow cytometry. At least 20,000 events were analyzed from each sample. Asterisks indicate statistically significant differences between groups (***) $p \leq 0.001$.

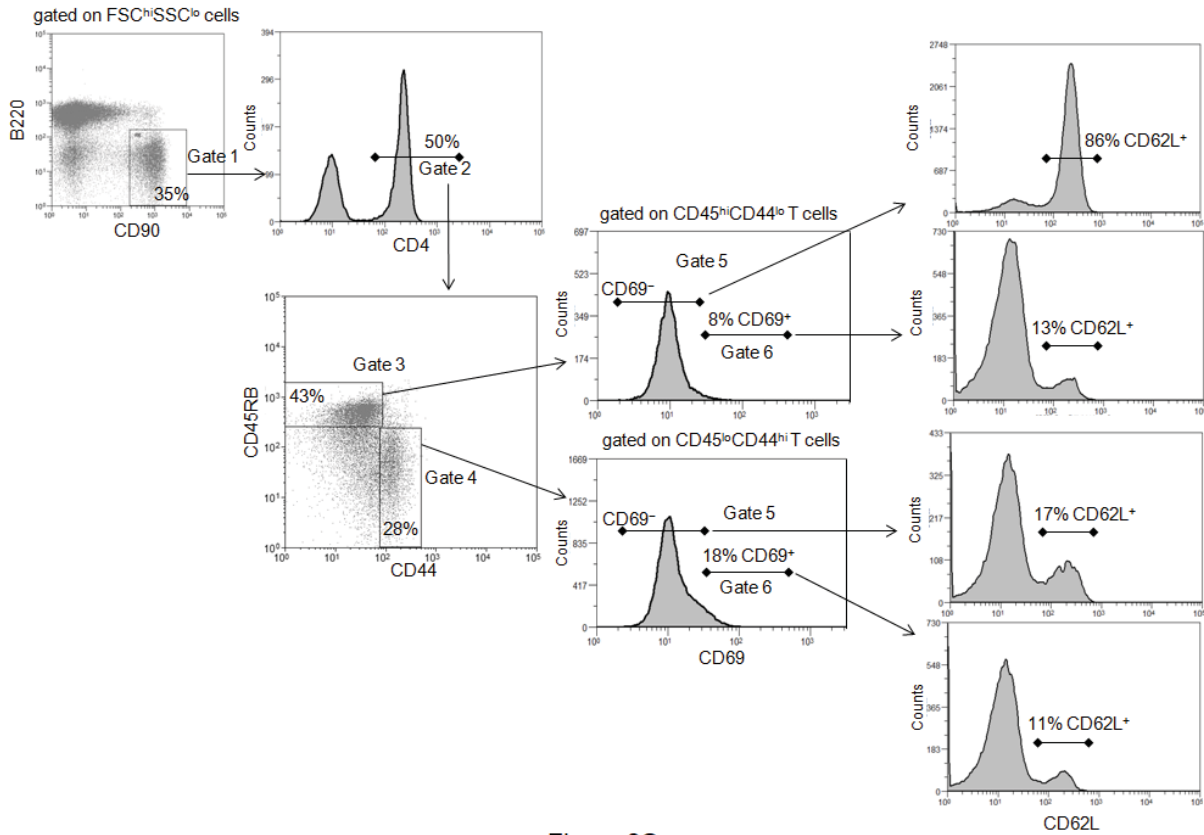
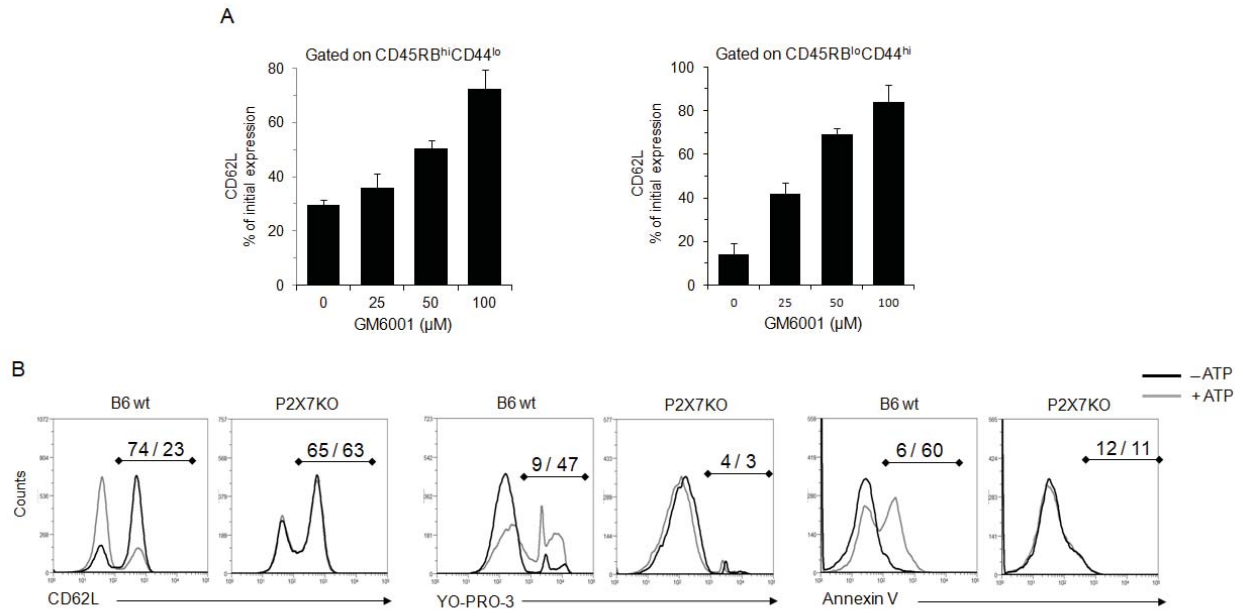


Figure S3

Figure S3 : Representative dot plots and histograms showing sequential gating for analyses of CD62L expression levels on CD45RB^{hi}CD44^{lo} naive and CD45RB^{lo}CD44^{hi} effector/memory CD4⁺ T cells (either CD69⁻ or CD69⁺). Spleen cells from B6 mice were stained with either fluorescent monoclonal antibodies against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD45RB, CD44, CD62L, and CD69 or isotype controls, and analyzed by flow cytometry. Mice had not been injected with concanavalin A to maintain a high frequency of naive and memory resting T cells. FSC vs. SSC dot plots were used to select single, viable cells and exclude debris, dead cells and doublets. CD90 vs. B220 dot plot was used to select B220⁻CD90⁺ T cells in the FSC^{hi} SSC^{lo}-gated cell population (Gate 1) and exclude B220⁺CD90⁺ T cells. The CD90⁺B220⁻ T cells were then further gated by the expression of CD4 (Gate 2). The relative expression of CD45RB and CD44 was analyzed on the CD4⁺ T-cell subset to identify CD45RB^{hi}CD44^{lo} naive cells (Gate 3) and CD45RB^{lo}CD44^{hi} effector/memory cells (Gate 4). Naive and memory/effector CD4⁺ T cells were then identified by the expression of CD69. Finally, the percentages of T cells expressing CD62L were gated on CD69⁻ (Gate 5) and CD69⁺ (Gate 6) cells. At least 20,000 events were analyzed from each sample.



Supplementary Figure 4

Figure S4 : Inhibition of CD62L shedding by metalloprotease inhibitor and absence of P2X7R signaling in P2X7KO mice. **(A)** Spleen cells from B6 mice ($n = 6$ mice/group) were preincubated with 0, 10, 25, 50, 100 μM of metalloprotease inhibitor GM6001 for 15 min at 37°C , and then either left unstimulated or stimulated with 2 mM adenosine-5'-triphosphate (ATP) for 30 min at 37°C . Cells were subsequently stained with monoclonal antibody (mAb) against CD62L and phenotypic markers. Cell surface expression of CD62L was assessed by flow cytometry in the gated $\text{CD}90^+$, $\text{CD}45\text{RB}^{\text{hi}}\text{CD}44^{\text{lo}}$ naive, and $\text{CD}45\text{RB}^{\text{lo}}\text{CD}44^{\text{hi}}$ effector/memory $\text{CD}4^+$ T cells. Bars represent the percentages of initial CD62L surface expression after ATP stimulation in the presence or absence of metalloprotease inhibitor. **(B)** Spleen cells from B6 and P2X7KO mice were either left unstimulated or stimulated with 2 mM ATP for 30 min in the presence or absence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were subsequently stained with fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD45RB, CD44, and CD62L as well as Annexin V fluorescent probe. CD62L shedding, pore formation or phosphatidylserine exposure were assessed within the gated $\text{CD}45\text{RB}^{\text{hi}}\text{CD}44^{\text{lo}}$ T-cell subset by flow cytometry. Flow cytometry histograms display the staining of spleen cells from B6 or P2X7KO mice with anti-CD62L antibody, YO-PRO-3, or Annexin V probe, left unstimulated (black line) or following ATP stimulation (gray line). Numbers inside each panel correspond to relevant cell percentages in unstimulated/stimulated conditions.

.II CD8⁺ but not CD4⁺ effector/memory T cells express the CD44^{high}CD45RB^{high} phenotype with aging, which displays reduced expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses

Amine Mellouk et Pierre Bobé.

Manuscrit en révision à **the FASEB journal**, 2018

Résumé

Dans cette étude, nous montrons que la faible activité de la voie P2X7R observée par certains auteurs dans les lymphocytes T CD8⁺ par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ n'est pas due à un défaut d'expression du récepteur mais à des différences de phénotypes entre les deux sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ au stade effecteur/mémoire. En effet, les lymphocytes T naïfs CD44^{low}CD45RB^{high}, CD4⁺ comme CD8⁺, présentent des taux d'expression membranaire et d'activités cellulaires similaires en réponse à l'ATP : ouverture du canal cationique, clivage de CD62L, externalisation des PS, formation de pores non sélectifs et induction de mort cellulaire. D'autre part, nous avons observé une diminution de la sensibilité des lymphocytes T CD8⁺ à l'ATP au cours du vieillissement des souris parallèlement à une forte augmentation du nombre de lymphocytes T effecteurs/mémoires dont le phénotype est différent de celui de la sous-population CD4⁺. En effet, ils sont majoritairement CD44^{high}CD45RB^{low} dans la sous-population CD4⁺ et CD44^{high}CD45RB^{high} dans la sous-population CD8⁺. Ces deux phénotypes englobent l'ensemble des lymphocytes T_{EM} (CD62L⁺CCR7⁺) et T_{CM} (CD62L⁻CCR7⁻). Les lymphocytes T CD44^{high}CD45RB^{low} (majoritairement CD4⁺) présentent des taux élevés de P2X7R à leur surface et induisent efficacement les fonctions cellulaires dépendantes de l'activation de la voie ATP/P2X7R. En revanche, Les lymphocytes T CD44^{high}CD45RB^{high} (majoritairement CD8⁺) présentent des taux plus faibles de P2X7R à leur surface et sont complètement réfractaires aux fonctions cellulaires induites par la voie ATP/P2X7R. L'expression des ecto-ATPases CD39 et CD73 à la surface des lymphocytes T ne semble pas influencer cette sensibilité à l'ATP.

1 **CD8⁺ but not CD4⁺ effector/memory T cells express the**
2 **CD44^{high}CD45RB^{high} phenotype with aging, which displays reduced**
3 **expression levels of P2X7 receptor and ATP-induced cellular responses.**

4 Amine Mellouk and Pierre Bobé

5
6 INSERM, Université Paris-Sud, UMR1174, Orsay, France,

7
8 *Corresponding author:* Pierre Bobé, INSERM, Université Paris-Sud, UMR1174, 91405 Orsay,
9 France; email: pierre.bobe@u-psud.fr; tel: +331 69 15 75 60; Fax: +331 69 15 58 93

10
11 *Running title:* P2X7R expression and functions in CD8⁺ T cells

12

13

1 **Nonstandard abbreviations**

2 mAb, monoclonal antibody; P2X7R, P2X7 receptor; PS, Phosphatidylserine; T_{EM}, effector memory;

3 T_{CM}, central memory

1 Abstract

2 Mouse splenic CD8⁺ T cells seem to express P2X7 receptor (P2X7R) and functions at lower levels
3 than CD4⁺ T cells. We have reported that the sensitivity of CD4⁺ T cells to ATP does not depend on
4 P2X7R expression levels but on their activation and differentiation stages. Therefore, we have
5 investigated herein a potential relationship between the sensitivity of CD8⁺ T cells to ATP and their
6 stages of differentiation. We found that the CD8⁺ subpopulation exhibits a drastically reduced
7 sensitivity to ATP with aging, which parallels the strong increase of a CD8⁺ subset expressing the
8 CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory phenotype with either high or low levels of CD62L, CCR7 and
9 CD127 expression. In contrast, the CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory subset is absent or poorly
10 expressed in the CD4⁺ T subpopulation regardless of age. While ATP treatment can trigger channel
11 and pore formation, CD62L shedding, PS exposure and cell death in the CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve CD8⁺
12 subset, it is unable to induce these cellular activities in the CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory CD8⁺
13 subset. Importantly, both CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory subsets
14 express similar low levels of P2X7R, demonstrating that the sensitivity of CD8⁺ T cells to ATP
15 depends on the stage of differentiation instead of P2X7R expression levels.

16

17 Key words

18 T_{EM} lymphocyte; T_{CM} lymphocyte; naïve T lymphocyte; Purinergic signaling

1 Introduction

2 The differentiation of mature CD4⁺ T cells from the naïve to memory stage is widely followed
3 by the differential expression of membrane phosphatase CD45RB (mouse) / CD45RA (human) and
4 cell adhesion molecules CD62L (L-selectin) and CD44. Naïve CD4⁺ T cells express high (hi) levels
5 of CD62L and CD45RB (CD62L⁺CD45RB^{hi}) and low (lo) levels of CD44 (CD44^{lo}). Memory CD4⁺ T
6 cells express high levels of CD44 and low levels of CD45RB/RA (1). Moreover, memory CD4⁺ T
7 cells expressing high levels of homing receptors CD62L and CCR7 (CD62L⁺CCR7⁺CD44^{hi}CD45RB^{lo})
8 are termed central memory cells (T_{CM}), while those displaying the CD62L⁻CCR7⁻CD44^{hi}CD45RB^{lo}
9 phenotype are termed effector memory cells (T_{EM}). Naïve CD8⁺ T cells express CD45RB, CD62L and
10 CD44 with a pattern similar to naïve CD4⁺ T cells (CD62L⁺CD44^{lo}CD45RB^{hi}). Memory CD8⁺ T cells
11 are usually characterized by the CD62L⁻CCR7⁻CD44^{hi} phenotype at the T_{EM} stage and the
12 CD62L⁺CCR7⁺CD44^{hi} phenotype at the T_{CM} stage. Thus, and in contrast with memory CD4⁺ T cells,
13 the differential expression of CD45RB/CD45RA and CD44 is rarely used to functionally distinguish
14 the various subsets of memory CD8⁺ T cells. Moreover, the T_{EM} and T_{CM} CD8⁺ subsets have been
15 characterized differently on the basis of CD45RB and CD44 expression levels. In one report, T_{EM} and
16 T_{CM} CD8⁺ cells are characterized as CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi}, respectively (2). In
17 another, T_{EM} and T_{CM} are considered to express high levels of both CD45RB and CD44 markers and
18 are distinguished using the expression levels of CD62L (3). The levels of CD62L membrane
19 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells are regulated by different mechanisms including proteolytic
20 cleavage from the cell surface. The activation of P2X7 receptor by high concentration of extracellular
21 ATP is one such mechanism, which regulates CD62L membrane expression in T cells (4-7).

22 The P2X7 receptor (P2X7R) is an ATP-gated cation channel. Numerous cellular and
23 physiological functions have been attributed to P2X7R. The types of cellular responses induced by
24 P2X7R depend on the length of stimulation by 0.5 to 1 mM concentrations of ATP in its tetra-anionic
25 form (ATP⁴⁻) (8). Brief stimulation of P2X7R induces cation-specific ion channels formation (9) and
26 phosphatidylserine (PS) exposure in the plasma membrane (10). Prolonged activation of P2X7R
27 results in the formation of nonselective membrane pores, permeable to large molecules of up to 900
28 Da (11, 12). Continuous activation of P2X7R can lead to cell death by apoptosis (13, 14) or necrosis
29 (15), depending on the cell type, the incubation time and ATP dose. In contrast, P2X7R activation
30 may trigger an anti-apoptotic or mitogenic activity (16-18). The physiological functions attributed to
31 P2X7R include maturation and secretion of cytokines such as IL-1 β , IL-18, IL-6 and TNF- α (19-23),
32 migration of leukocytes (24), proteolytic cleavage of membrane proteins such as CD23 (low affinity
33 receptor for IgE), TNF- α (25), IL-6 receptor (26) and the amyloid precursor protein (27), and killing
34 of intracellular pathogens in macrophages (28, 29). P2X7R is involved in the early signaling events
35 that regulate T-cell activation especially Ca²⁺ influx, NF-AT activation, and IL-2 production (30-33).
36 ATP through the activation of P2X7 regulates the differentiation of CD4⁺ T cells into Th17 cells (34,

37 35) and the conversion of regulatory CD4⁺ T cells (Treg) into Th17 cells (36). Recently, we have
38 reported that the regulation of T cell sensitivity to ATP is far more complex than previously
39 considered. We found a complete dissociation of ATP-induced cellular activities during the activation
40 and differentiation of conventional CD4⁺ T cells, regardless of P2X7R and ectonucleotidases CD39
41 and CD73 expression levels (7). For instance, activated naïve CD69⁺CD44^{lo}CD45RB^{hi} T cells show a
42 significantly reduced ability to proteolytically cleave CD62L compared to naïve CD69⁻
43 CD44^{lo}CD45RB^{hi} T cells although they express higher levels of P2X7R. The reverse situation was
44 observed for ATP-induced pore formation and, to a lesser extent, PS externalization, which were
45 significantly upregulated in recently activated naïve compared to naïve T cells (7). Moreover, we
46 have reported that effector T cells, at pre-apoptotic stage, become totally resistant to P2X7R
47 stimulation due to the loss of P2X7R expression at the plasma membrane (37). In CD8⁺ T cells, ATP-
48 induced cellular responses have been reported in only a few studies. For one study, CD8⁺ T cells from
49 the spleen, lymph nodes or liver exhibit low levels of P2X7R membrane expression and ATP
50 sensitivity to PS externalization and pore formation, whereas both are displayed at high levels in
51 intestinal CD8⁺ T cells (38). For another study, P2X7R-induced CD62L shedding is triggered in CD8⁺
52 T cells as efficiently as in CD4⁺ T cells (39). Since these previous reports appear contradictory, the
53 present study has evaluated the ability of naïve and effector/memory CD8⁺ T cells from secondary
54 lymphoid organs to trigger the main P2X7R-induced cellular activities namely ion channel opening,
55 pore formation, CD62L shedding, PS externalization and cell death. Moreover, we have correlated the
56 cellular responses induced by ATP with the expression levels of membrane P2X7R and nucleotidases
57 CD39 and CD73.

1 **Materials and Methods**

2 *Reagents*

3 ATP (adenosine-5'-triphosphate) and P2X7R-inhibitor A438079 were purchased from Sigma-
4 Aldrich (St. Louis, MO). YO-PRO-3 and Fluo-4 AM probes were from Life Technologies (Carlsbad,
5 CA). ATP solutions were prepared extemporaneously from 100 mM stock solution (pH 7.4) stored at
6 -20°C. Because divalent ions affect the potency of ATP⁴⁻ to bind to P2X7R, the cell medium used to
7 activate PX7R contains low concentrations of Mg²⁺.

8

9 *Mice*

10 Wild-type C57BL/6J (B6) mice originally from Charles River Laboratories (Ecully, France)
11 were maintained in our animal facilities (animalerie NeuroPSI, Orsay, France). All the experiments
12 were conducted in accordance with French (décret n° 2013-118) and EU (directive 86/609/EEC)
13 guidelines for the care of laboratory animals and approved by our local research ethics committee
14 (CEEA 59).

15

16 *Flow cytometry immunophenotyping assays*

17 Spleen cell suspensions were phenotyped by flow cytometry using fluorescent-conjugated
18 monoclonal antibody (mAb): anti-CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-
19 CD45RB (clone C363.16A), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD44 (clone
20 IM7) anti-CD62L (clone MEL-14), anti-CD127/IL-7 receptor- α (clone A7R34) anti-CD197/CC-
21 chemokine receptor 7 (CCR7) (clone, 4B12), anti-CD39 (clone 24DMS1) and anti-CD73 (clone
22 TY/11.8) (all from eBioscience). P2X7R was detected using a rabbit polyclonal anti-P2X7R serum
23 described previously (7, 37) and fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary
24 antibodies (eBioscience). Fluorescent-conjugated rat IgG2a and IgG2b or Armenian hamster IgG
25 mAbs were used as the isotype control (eBioscience). Use of mAb specific for mouse Fc γ receptor
26 (eBioscience) avoided non-specific antibody binding. Data acquisition was performed at the Flow
27 cytometry core facility at I2BC, CNRS UMR 9198.

28

29 *CD62L shedding, PS exposure, Pore formation and cell death assays*

30 Spleen cells suspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen, France) were treated with ATP in a
31 humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 30 min or 2 h, depending on the assay. After washing

32 with RPMI 1640 medium, cells were resuspended in FACS buffer (eBioscience) and stained for 30
33 min on ice with phenotype-specific fluorescent mAbs and fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb to
34 assess CD62L shedding. PS cell surface exposure was detected on mAb-labeled cells using FITC- or
35 PE-Annexin V apoptosis detection kit according to the manufacturer's specifications (eBioscience,
36 France). To quantify P2X7R-mediated pore formation, ATP treatment was performed in the presence
37 of the orange-fluorescent YO-PRO-3 (molecular weight 655 Da) nucleic acid dye, depending on the
38 fluorochromes used in the phenotyping step. Cell morphology (FSC/SSC) and Annexin V staining
39 were used to quantify dead/dying cells (Annexin V⁺ FSC^{low} SSC^{high}) by flow cytometry. In some
40 experiments, cells were pretreated with P2X7R antagonist A438079 for 30 min at 37°C with 5% CO₂
41 prior treatment with ATP.

42

43 *Calcium influx assay*

44 Spleen cells suspended in RPMI buffer were loaded for 20 min at room temperature with 3 μM
45 calcium-reactive fluorescence probe Fluo-4 AM, according to the manufacturer's specifications (Life
46 Technologies). Cells were then stained with phenotype-specific fluorescent mAbs (30 min on ice)
47 prior to stimulation with ATP. Changes in mean fluorescence intensity (MFI) of Fluo-4 AM overtime
48 were measured in the T-cell subsets by flow cytometry (CytoFLEX, Beckman Coulter). In some
49 experiments, cells were pretreated with P2X7R antagonist A438079 for 5 min at 37°C prior to the
50 treatment with ATP. Data acquisition was performed at the Imaging and Cytometry platform at
51 Généthon (Evry, France).

52

53 *Statistical analysis*

54 Data are reported as mean ± standard error of mean (SEM). Comparisons between untreated
55 and treated groups were made by Student's t-test. Degrees of significance are indicated as follows: *
56 $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

1 **Results**

2 **CD8⁺ T cells express lower levels of ATP-mediated cellular responses than CD4⁺ T cells**

3 While ATP-mediated cellular responses are extensively studied in CD4⁺ T cells, they remain
 4 understudied in CD8⁺ T cells. To gain insight on the sensitivity to ATP of CD8⁺ T cells from the
 5 spleen or lymph nodes, we have compared the levels of ATP-mediated CD62L shedding, PS exposure
 6 and pores formation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 1). Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were able
 7 to efficiently shed CD62L, expose PS and form pores in the presence of ATP, but with significantly
 8 higher amplitude in CD4⁺ than CD8⁺ T cells (Fig. 1). The lower sensitivity of CD8⁺ T cells to ATP
 9 might be related to differences in the composition (naïve, T_{EM}, T_{CM}) of the CD8⁺ and CD4⁺ T-cell
 10 subsets as the CD4⁺ T-cell subset encompasses conventional and regulatory T cells. Indeed, we have
 11 recently reported that the cellular activities induced in CD4⁺ T cells by extracellular ATP depend on
 12 their stage of activation and/or differentiation (7).

13

14 **Characterization of T_{EM} and T_{CM} cell subsets within the CD8⁺ and CD4⁺ subpopulations**

15 Gated CD8⁺ and CD4⁺ T cells (Supplementary Fig. 1A) were analyzed for CD45RB, CD44,
 16 CD62L, CCR7 and CD127 expression levels to define naïve, T_{EM} and T_{CM} cell subsets (Fig. 2).
 17 Within the CD8⁺ and CD4⁺ T-cell subpopulations from the spleen of 7-week-old B6 mice (young), a
 18 strong majority of cells (75 to 85%) expressed the naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi} phenotype (Fig. 2A). The
 19 numbers of CD8⁺ and CD4⁺ naïve T cells (42 ± 1% and 41 ± 5%) were significantly decreased in 45-
 20 week-old mice (Fig. 2B), because T cells had mainly acquired the CD44^{hi}CD45RB^{lo} T_{EM} and T_{CM}
 21 phenotype in the CD4⁺ (40 ± 3%) but not CD8⁺ (9 ± 1%) subpopulation (Fig. 2B). Within the CD8⁺
 22 subpopulation, CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve T cells mostly became CD44^{hi}CD45RB^{hi} T cells (45 ± 3%)
 23 (Fig. 2B), whereas only a minority of CD4⁺ T cells (4 ± 0.5%) expressed this phenotype with aging.
 24 Importantly, the CD44^{hi}CD45RB^{hi} phenotype is expressed by 15 ± 0.4% of CD8⁺ T cells from young
 25 mice versus 2.6 ± 0.1% of CD4⁺ T cells (Fig. 2A), suggesting that this cell subset is unique to the
 26 CD8⁺ subpopulation. As expected, naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi} T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) expressed
 27 high levels of CD62L, CCR7 and CD127 at the plasma membrane (Fig. 2C). At the CD44^{hi}CD45RB^{lo}
 28 or CD44^{hi}CD45RB^{hi} phenotype, only a part of the CD4⁺ or CD8⁺ T-cell subpopulations expressed the
 29 CD62L, CCR7 and CD127 markers, suggesting that these two phenotypes could encompass T cells at
 30 the T_{EM} or T_{CM} differentiation stage.

31

32 **T_{EM} and T_{CM} CD8⁺ cells express lower levels of P2X7R membrane expression than their CD4⁺** 33 **counterparts**

34 In addition to the stage of activation and/or differentiation, reduced levels of P2X7R membrane
 35 expression could account for the lower sensitivity of CD8⁺ T cells to ATP. Therefore, we have
 36 quantified P2X7R on CD44^{lo}CD45RB^{hi}, CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} T-cell subsets (either
 37 CD4⁺ or CD8⁺) from the spleen of 7-week-old (young) and 45-week-old mice using a rabbit
 38 polyclonal anti-P2X7R serum and flow cytometry (Fig. 3). We found that similar levels of P2X7R
 39 were expressed on whole CD8⁺ and CD4⁺ T cells from young mice (Fig. 3A), which were significantly
 40 increased on CD4⁺ but not on CD8⁺ T cells with aging (Fig. 3B). As expected (7), the
 41 CD44^{hi}CD45RB^{lo} T_{EM} and T_{CM} CD4⁺ subsets expressed P2X7R at a significant higher level than
 42 CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve CD4⁺ subset, regardless of the age of the mice at the time of analysis (Figs.
 43 3C and 3D). As mentioned above (Fig. 2), we did not detect the CD44^{hi}CD45RB^{lo} subset within the
 44 CD8⁺ subpopulation from young mice, and instead we found the CD44^{hi}CD45RB^{hi} subset that
 45 displayed similar low levels of P2X7R than naïve T cells (Fig. 3C). Moreover, the levels of P2X7R
 46 expression on CD44^{hi}CD45RB^{hi} cells did not change with aging (Fig. 3D). In the CD4⁺
 47 subpopulation, the CD44^{hi}CD45RB^{hi} subset expressed P2X7R at a similar level as their CD8⁺
 48 counterpart (Fig. 3D). P2X7R was not quantified on CD44^{hi}CD45RB^{hi} subset from young mice due to
 49 their very low numbers. Altogether our results suggest that CD44^{hi}CD45RB^{hi} and CD44^{hi}CD45RB^{lo}
 50 are the main phenotypes expressed by the effector/memory CD8⁺ and CD4⁺ T-cell subpopulations,
 51 respectively. Moreover, while the level of P2X7R membrane expression is upregulated on the
 52 effector/memory CD44^{hi}CD45RB^{lo} subset compared to naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi} T cells, its expression
 53 remains at low level on the CD44^{hi}CD45RB^{hi} subset.

54

55 **Loss of calcium influx in T_{EM} and T_{CM} CD8⁺ cell subsets**

56 The data presented above suggest that the lower sensitivity of CD8⁺ T cells to ATP compared to
 57 CD4⁺ T cells (Fig. 1) might be due to the accumulation of high numbers of effector/memory T cells
 58 that expressed the P2X7R^{lo}CD44^{hi}CD45RB^{hi} phenotype with aging (Figs. 2 and 3). To test our
 59 hypothesis, we have used the capacity of P2X7R to form a cationic channel on the plasma membrane,
 60 which promotes calcium entry from the extracellular space. Therefore, using flow cytometry we have
 61 analyzed by the kinetics of changes in intracellular calcium concentration in Fluo-4 AM-loaded
 62 CD44^{lo}CD45RB^{hi}, CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) following
 63 activation by ATP. ATP-stimulated CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) and
 64 CD44^{lo}CD45RB^{hi} effector/memory CD4⁺ T cells (not detected in CD8⁺ subpopulation) were able to
 65 form a cationic channel responsible for calcium entry (~ 2- to 4-fold increase depending on the
 66 differentiation stage), whereas CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory CD8⁺ T cells (poorly detected in
 67 CD4⁺ subpopulation) were totally resistant to ATP-mediated calcium influx (Fig. 4, Table 1). The
 68 increase of calcium influx was observed in CD44^{hi}CD45RB^{lo} T_{EM} and T_{CM} CD4⁺ cells even in the

69 presence of low amounts of extracellular calcium (Fig. 4B). The presence of a higher concentration of
70 extracellular calcium, significantly increased calcium entry in CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve CD4⁺ and CD8⁺
71 T cells less than 2 min after ATP stimulation, which suggests the opening of calcium-dependent pores
72 with larger size than cation channels (Fig. 4). ATP-induced calcium entry in naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi}
73 T cells and effector/memory CD44^{hi}CD45RB^{lo} T cells could be prevented by the P2X7R inhibitor
74 A438079 (Fig. 4), confirming the specificity of channel formation and calcium entry. The SERCA
75 pump inhibitor Thapsigargin was added after the stimulation with ATP to verify that T cells were
76 efficiently loaded with Fluo-4 AM Ca²⁺ indicator. Moreover, the inhibition of SERCA pumps by
77 Thapsigargin shows that the increase of cytosolic Ca²⁺ levels through P2X7R channels is due to Ca²⁺
78 entry from the extracellular medium and not the endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores (supplementary
79 Fig. 1B).

80

81 **Loss of ATP-mediated CD62L shedding, pore formation, PS exposure and cell death in** 82 **CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} but not CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve CD8⁺ T cells**

83 Although CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve as well as CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} CD8⁺ subsets
84 expressed similar low levels of P2X7R on plasma membrane (Fig. 3), only CD44^{hi}CD45RB^{hi} cells
85 were defective in ATP-mediated ion channel opening (Fig. 4). Therefore, ATP-induced CD62L
86 shedding, pore formation, PS exposure and cell death were analyzed on gated CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve
87 and CD44^{hi}CD45RB^{lo} or CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells (either CD4⁺ or CD8⁺). We analyzed
88 these cellular responses in the spleen of 45-week-old mice due to the low percentages of T_{EM} and T_{CM}
89 cells (either CD44^{hi}CD45RB^{hi} or CD44^{hi}CD45RB^{lo}) in the CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations from
90 younger mice. Both CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve and CD44^{hi}CD45RB^{lo} T_{EM} and T_{CM} cells, although
91 expressing very different levels of P2X7R on CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations (Fig. 3) were able to
92 shed CD62L (Fig. 5A and supplementary Fig. 2), externalize PS (Fig. 5B and supplementary Fig. 2),
93 form pores (Fig. 5C and supplementary Fig. 2) and enter cell death (Fig. 6B) with efficiency in the
94 presence of ATP. However, while no significant differences appeared between naïve CD4⁺ and CD8⁺
95 T cells in terms of sensitivity to ATP-mediated cellular responses, T_{EM} and T_{CM} CD4⁺ cells were more
96 responsive to ATP than their CD8⁺ counterparts. In contrast, CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells
97 show a massive decrease in ATP-mediated CD62L shedding, pore formation, PS exposure and cell
98 death especially within the CD8⁺ subpopulation (Figs. 5 and 6, Table1).

99 Altogether, our data suggest that the lower sensitivity of the CD8⁺ subpopulation to P2X7R-
100 mediated cellular activities with aging are due to the accumulation of T_{EM} and T_{CM} cells expressing the
101 CD44^{hi}CD45RB^{hi} phenotype.

102

103 **Ectonucleotidases expression on CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} or T_{CM} cells**

104 The reduced sensitivity of CD45RB^{hi}CD44^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells to P2X7R-mediated cellular
105 responses might be due to enhanced hydrolysis of ATP following overexpression of the membrane
106 ectonucleotidases CD39 and CD73. Using flow cytometry we have analyzed ectonucleotidases
107 expression levels on T_{EM} and T_{CM} cells with either the CD44^{hi}CD45RB^{lo} or CD44^{hi}CD45RB^{hi}
108 phenotype (Supplementary Fig. 3). We found higher levels of CD39, but not CD73 on
109 CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} than on CD44^{lo}CD45RB^{hi} naive CD8⁺ T cells, which may explain their
110 lower sensitivity to ATP. However, CD44^{lo}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells expressed significantly
111 higher levels of both CD39 and CD73 than CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells and yet they were
112 highly sensitive to ATP. It is therefore likely that CD39 and CD73 do not control P2X7-mediated
113 cellular activities in CD44^{lo}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells.

1 Discussion

2 The ATP/P2X7R pathway plays a major role in both innate and adaptive immunity. Therefore,
3 its involvement in the development of inflammatory and autoimmune diseases is extensively studied.
4 However, protective or detrimental effects of P2X7R on disease onset and/or development have been
5 observed (20, 40). These contradictory results emphasize the need for further characterization of how
6 the various cellular functions triggered by the ATP/P2X7R signaling pathway are regulated in
7 lymphocytes under normal and pathological situations. Cellular responses induced by extracellular
8 ATP in T lymphocytes are complex. Thus, autocrine activation of P2X7R regulates the activation of T
9 cells (30-33). In apparent contrast with its role in T-cell activation, P2X7R stimulation can lead to T
10 cell death (41). Recently, we have shown a complete dissociation of ATP-induced cellular activities
11 during the activation and differentiation of conventional CD4⁺ T cells, regardless of the levels of
12 P2X7R and ectonucleotidases CD39 and CD73 membrane expression (7). Moreover, we have
13 reported that effector T cells become totally resistant to ATP-induced cellular responses at the
14 preapoptotic stage (37). In contrast to CD4⁺ T cells (conventional or regulatory), little studies have
15 been performed to quantify ATP-induced cellular responses in CD8⁺ T cells. Moreover, the few
16 reports on the sensitivity of CD8⁺ T cells to extracellular ATP seem contradictory (38, 39). Therefore,
17 in the present study through the main cellular activities (ion channel opening, pore formation, CD62L
18 shedding, PS externalization, cell death) triggered following the stimulation of P2X7R, we have
19 compared the sensitivity of CD8⁺ and CD4⁺ T cells to ATP in relation with 1) their stages of
20 differentiation (naïve or effector/memory) and the phenotype expressed by effector/memory (either
21 CD44^{hi}CD45RB^{lo} or CD44^{hi}CD45RB^{hi}) T cells; 2) the expression levels of P2X7R and
22 ectonucleotidases CD39 and CD73 on naïve and effector/memory (either CD44^{lo}CD45RB^{hi} or
23 CD44^{hi}CD45RB^{hi}) CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Table1).

24 In the present study, using CD45RB, CD44, CD62L, CCR7 and CD127 markers and flow
25 cytometry, we show that the expression profiles of CD45RB and CD44 by effector/memory T cells
26 (rather than those of CCR7 or CD127) allowed the characterization of T_{CM} and T_{EM} cells that display
27 distinct phenotype, CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi}, and opposite sensitivity to extracellular
28 ATP. Thus, both subsets can express CD62L, CCR7 and CD127 at high or low levels, suggesting that
29 CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} subsets encompass T cells at the T_{EM} or T_{CM} stage.
30 Importantly, we found that CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory cells are not
31 present in similar numbers among the CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations. Thus, the CD44^{hi}CD45RB^{lo}
32 and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory phenotype are mainly expressed by CD4⁺ and CD8⁺ T cells,
33 respectively. Moreover, we found that the CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} subsets could also
34 be distinguished by their levels of P2X7R membrane expression and ATP-induced cellular responses.
35 Thus, CD44^{hi}CD45RB^{lo} T_{EM} and T_{CM} cells express high levels of both P2X7R membrane expression
36 and ATP-mediated extracellular Ca²⁺ entry, pore formation, CD62L shedding, PS externalization and

37 cell death, whereas CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells express low levels of P2X7R membrane
38 expression and are devoid of any ATP-mediated cellular activities. Interestingly, the low level of
39 P2X7R expression on CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells cannot alone account for the absence of
40 ATP-induced cellular activities in this cell subset because CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve CD8⁺ T cells that
41 express similar low levels of P2X7R are able to efficiently form channels and pores, shed CD62L,
42 externalize PS and induce cell death in the presence of ATP. Our present data on the sensitivity of
43 CD8⁺ T cells to ATP are reminiscent of those presented in our recent report showing a complete
44 dissociation of ATP-induced cellular activities during the activation and differentiation of
45 conventional CD4⁺ T cells, regardless of the levels of P2X7R (7). Multiple regulatory mechanisms are
46 likely involved in the control of sensitivity to extracellular ATP in the naïve and T_{EM} and T_{CM} CD8⁺ T-
47 cell subsets. Variation in P2X7R structure might explain the differential sensitivity to ATP displayed
48 by the various T cell subsets (18, 42). However, using real time RT-PCR analysis, we found that all T
49 cell subsets expressed the P2X7K splice variant (unpublished data). Membrane-bound nucleotidases
50 play a central role in cell sensitivity to ATP by regulating the extracellular concentration of ATP.
51 Thus, ectonucleotidase CD39 and CD73 sequentially hydrolyze ATP into ADP, AMP and adenosine.
52 The lower sensitivity of CD44^{hi}CD45RB^{hi} T_{EM} and T_{CM} cells to ATP compared to CD44^{lo}CD45RB^{hi}
53 naïve CD8⁺ T cells can be due to the upregulation of CD39 found on T_{EM} and T_{CM} cells. However,
54 CD44^{hi}CD45RB^{lo} T_{EM} and T_{CM} CD4⁺ T cells express high levels of ectonucleotidase CD39 and CD73
55 and yet they are highly responsive to ATP, suggesting that ectonucleotidases CD39 and CD73 do not
56 play a central role in the control of P2X7-mediated cellular activities in T_{EM} and T_{CM} cells (either
57 CD4⁺ or CD8⁺). Likewise, we have shown that CD39 and CD73 are not essential for regulating the
58 sensitivity of conventional CD4⁺ T cells to ATP (7). Moreover, although CD39 and CD73 are
59 expressed at high levels on Tregs (43), they are highly sensitive to ATP-induced cellular responses.

60 The control of intracellular calcium levels is critical to T cell functions. ATP-induced Ca²⁺
61 influx most likely plays a central role in P2X7R-mediated T cell activation and differentiation (30-36).
62 We show herein that extracellular ATP can trigger an approximately 2-fold increase of cytosolic Ca²⁺
63 levels in the CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations at the CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve stage, and an
64 approximately 4-fold increase in T_{EM} and T_{CM} cells expressing the prevalent CD44^{hi}CD45RB^{lo}
65 phenotype (mainly CD4⁺). Importantly, T_{EM} and T_{CM} cells with the CD44^{hi}CD45RB^{hi} phenotype
66 (mainly CD8⁺) are able to cause channel formation and induce Ca²⁺ entry in the presence of
67 extracellular ATP. Therefore, our data suggest that the ATP/P2X7R pathway is not involved in CD8⁺
68 T cell activation and differentiation during secondary immune responses. Moreover, the
69 CD44^{hi}CD45RB^{hi} CD8⁺ T subset displays total resistance to cell death induced by ATP, suggesting
70 that these CD8⁺ T cells could survive and perform their effector activity in inflammatory tissues with
71 high concentrations of extracellular ATP, whereas CD44^{hi}CD45RB^{lo} CD4⁺ T cells could die in such
72 tissue environment. The membrane phosphatase B220 is expressed on human and murine effector T

73 cells at preapoptotic stage (44, 45) as well as on a subset of suppressor/regulatory T cells (46, 47).
74 Previously, we have reported that B220-expressing effector T cells were totally resistant to ATP
75 stimulation due to the loss of P2X7R membrane expression (37). Likewise, B220⁻CD44^{hi}CD45RB^{hi}
76 T_{EM} and T_{CM} cells (mainly CD8⁺) are totally resistant to ATP-induced cellular responses, indicating
77 that the downregulation of P2X7R expression and functions are not restricted to dying T cells and
78 could originate upstream of the preapoptotic stage.

79 To summarize, CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells express similar levels of P2X7R
80 membrane expression and ATP-induced cellular responses. Effector/memory T cells expressing the
81 CD44^{hi}CD45RB^{lo} phenotype (mainly CD4⁺) show high levels of P2X7R membrane expression and
82 sensitivity to ATP compared to their naïve counterparts. In contrast, effector/memory T cells defined
83 as CD44^{hi}CD45RB^{hi} (mainly CD8⁺) are totally resistant to ATP and displays similar low level of
84 P2X7R membrane expression than in naïve T cells (either CD4⁺ or CD8⁺). Therefore, P2X7R-
85 mediated cellular activities in CD8⁺ T cells expressing the CD44^{hi}CD45RB^{hi} phenotype are not
86 dependent on the levels of P2X7R membrane expression and depend on their stages of differentiation.

1 **Acknowledgement**

2 *Funding:* This work has been funded by grants from ANR – Agence Nationale de la Recherche (ANR-
3 13-ISV6-0003).

4

5 *Conflict of Interest Statement*

6 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
7 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

8

9 *Author Contributions*

10 AM and PB conceived, designed, performed the experiments and analyzed data. PB wrote the paper.

1 References

- 2 1. Ma, C. S., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. (2004) Automatic generation of lymphocyte
3 heterogeneity: Division-dependent changes in the expression of CD27, CCR7 and CD45 by
4 activated human naive CD4⁺ T cells are independently regulated. *Immunol Cell Biol* 82, 67-74
- 5 2. Jobe, O., Donofrio, G., Sun, G., Liepinsh, D., Schwenk, R., and Krzych, U. (2009)
6 Immunization with radiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites induces liver
7 cCD8 α ⁺DC that activate CD8⁺T cells against liver-stage malaria. *PLoS One* 4, e5075
- 8 3. Meraldi, V., Romero, J. F., Kensil, C., and Corradin, G. (2005) A strong CD8⁺ T cell response
9 is elicited using the synthetic polypeptide from the C-terminus of the circumsporozoite protein
10 of *Plasmodium berghei* together with the adjuvant QS-21: quantitative and phenotypic
11 comparison with the vaccine model of irradiated sporozoites. *Vaccine* 23, 2801-2812
- 12 4. Gu, B., Bendall, L. J., and Wiley, J. S. (1998) Adenosine triphosphate-induced shedding of
13 CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different
14 metalloproteases. *Blood* 92, 946-951
- 15 5. Ho, J., Kurtz, C. C., Naganuma, M., Ernst, P. B., Cominelli, F., and Rivera-Nieves, J. (2008) A
16 CD8⁺/CD103^{high} T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* 180,
17 2573-2580
- 18 6. Le Gall, S. M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X. D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad,
19 D., Saftig, P., and Blobel, C. P. (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated
20 components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming
21 growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20, 1785-1794
- 22 7. Safya, H., Mellouk, A., Legrand, J., Le Gall, S. M., Benbijja, M., Kanellopoulos-Langevin, C.,
23 Kanellopoulos, J. M., and Bobé, P. (2018) Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to
24 Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels
25 but on Their Activation and Differentiation Stage. *Front Immunol* 9, 360
- 26 8. Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., and Falzoni, S. (2017) The P2X7
27 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15-31
- 28
- 29 9. Wiley, J. S., Chen, R., Wiley, M. J., and Jamieson, G. P. (1992) The ATP4⁻ receptor-operated
30 ion channel of human lymphocytes: inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by
31 extracellular sodium ions. *Archives of biochemistry and biophysics* 292, 411-418

- 32 10. Mackenzie, A. B., Young, M. T., Adinolfi, E., and Surprenant, A. (2005) Pseudoapoptosis
33 induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem* 280, 33968-33976
- 34 11. Steinberg, T. H., Newman, A. S., Swanson, J. A., and Silverstein, S. C. (1987) ATP4-
35 permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem*
36 262, 8884-8888
- 37 12. Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., and Buell, G. (1996) The cytolytic
38 P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-738
- 39 13. Ferrari, D., Los, M., Bauer, M. K., Vandenamee, P., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K.
40 (1999) P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in
41 apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* 447, 71-75
- 42 14. Humphreys, B. D., Rice, J., Kertesz, S. B., and Dubyak, G. R. (2000) Stress-activated protein
43 kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J*
44 *Biol Chem* 275, 26792-26798
- 45 15. Auger, R., Motta, I., Benihoud, K., Ojcius, D. M., and Kanellopoulos, J. M. (2005) A role for
46 mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7
47 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 280, 28142-28151
- 48 16. Baricordi, O. R., Ferrari, D., Melchiorri, L., Chiozzi, P., Hanau, S., Chiari, E., Rubini, M., and
49 Di Virgilio, F. (1996) An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human
50 T lymphocytes. *Blood* 87, 682-690
- 51 17. Adinolfi, E., Callegari, M. G., Cirillo, M., Pinton, P., Giorgi, C., Cavagna, D., Rizzuto, R., and
52 Di Virgilio, F. (2009) Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the
53 endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* 284,
54 10120-10128
- 55 18. Adinolfi, E., Cirillo, M., Woltersdorf, R., Falzoni, S., Chiozzi, P., Pellegatti, P., Callegari, M.
56 G., Sandona, D., Markwardt, F., Schmalzing, G., and Di Virgilio, F. (2010) Trophic activity of a
57 naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* 24, 3393-3404
- 58 19. Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J.,
59 and Gabel, C. A. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol*
60 *Chem* 276, 125-132

- 61 20. Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., Brissette,
62 W., Wicks, J. R., Audoly, L., and Gabel, C. A. (2002) Absence of the P2X7 receptor alters
63 leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 168, 6436-6445
- 64 21. Colomar, A., Marty, V., Medina, C., Combe, C., Parnet, P., and Amedee, T. (2003) Maturation
65 and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the
66 stimulation of P2X7 receptors. *J Biol Chem* 278, 30732-30740
- 67 22. Kahlenberg, J. M., and Dubyak, G. R. (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7
68 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1100-1108
- 69 23. Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di
70 Virgilio, F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*
71 176, 3877-3883
- 72 24. McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C., Beck, P.
73 L., Muruve, D. A., and Kubes, P. (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites
74 of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366
- 75 25. Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K., and Nakata, Y. (2004) Production and
76 release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J*
77 *Neurosci* 24, 1-7
- 78 26. Garbers, C., Janner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., Koch-Nolte, F.,
79 Rose-John, S., and Scheller, J. (2011) Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins
80 in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor
81 shedding. *J Biol Chem* 286, 14804-14811
- 82 27. Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B., and Kanellopoulos, J. M. (2011) The
83 purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase dependent processing of the amyloid
84 precursor protein. *J. Biol. Chem* 286, 2596-2606
- 85 28. Lammas, D. A., Stober, C., Harvey, C. J., Kendrick, N., Panchalingam, S., and Kumararatne, D.
86 S. (1997) ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by
87 purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity* 7, 433-444
- 88 29. Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M. N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville,
89 T., and Ojcius, D. M. (2003) Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-
90 dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19, 403-412

- 91 30. Loomis, W. H., Namiki, S., Ostrom, R. S., Insel, P. A., and Junger, W. G. (2003) Hypertonic
92 stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release,
93 P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 278, 4590-4596
- 94 31. Schenk, U., Westendorf, A. M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C.,
95 Buer, J., Scanziani, E., and Grassi, F. (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP
96 released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1, ra6
- 97 32. Tsukimoto, M., Tokunaga, A., Harada, H., and Kojima, S. (2009) Blockade of murine T cell
98 activation by antagonists of P2Y6 and P2X7 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 384,
99 512-518
- 100 33. Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., Ferrari, V., Insel, P. A., and
101 Junger, W. G. (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7
102 receptors. *FASEB J* 23, 1685-1693
- 103 34. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H.,
104 Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K. (2008) ATP drives lamina propria T(H)17 cell
105 differentiation. *Nature* 455, 808-812
- 106 35. Purvis, H. A., Anderson, A. E., Young, D. A., Isaacs, J. D., and Hilkens, C. M. (2014) A
107 negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *Journal of*
108 *immunology* 193, 1142-1150
- 109 36. Schenk, U., Frascoli, M., Proietti, M., Geffers, R., Traggiai, E., Buer, J., Ricordi, C.,
110 Westendorf, A. M., and Grassi, F. (2011) ATP Inhibits the Generation and Function of
111 Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors. *Science Signaling* 4,
112 ra.12
- 113 37. Le Gall, S. M., Legrand, J., Benbijja, M., Safya, H., Benihoud, K., Kanellopoulos, J. M., and
114 Bobé, P. (2012) Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic
115 B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* 7, e52161
- 116 38. Heiss, K., Janner, N., Mahnss, B., Schumacher, V., Koch-Nolte, F., Haag, F., and Mittrucker, H.
117 W. (2008) High sensitivity of intestinal CD8+ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a
118 regulator for intestinal T cell responses. *J Immunol* 181, 3861-3869
- 119 39. Sluyter, R., and Wiley, J. S. (2014) P2X7 receptor activation induces CD62L shedding from
120 human CD4+ and CD8+ T cells. *Inflamm Cell Signal* 1, 44-49

- 121 40. Chen, L., and Brosnan, C. F. (2006) Exacerbation of experimental autoimmune
122 encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes.
123 *Journal of immunology* 176, 3115-3126
- 124 41. Tsukimoto, M., Maehata, M., Harada, H., Ikari, A., Takagi, K., and Degawa, M. (2006) P2X7
125 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by
126 dual signaling pathways. *Journal of immunology* 177, 2842-2850
- 127 42. Nicke, A., Kuan, Y.-H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., Gorecki, D.
128 C., Murrell-Lagnado, R. D., and Soto, F. (2009) A functional P2X7 splice variant with an
129 alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *The*
130 *Journal of biological chemistry* 284, 25813-25822
- 131 43. Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji,
132 K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., and Robson, S. C. (2007) Adenosine
133 generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune
134 suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1257-1265
- 135 44. Renno, T., Attinger, A., Rimoldi, D., Hahne, M., Tschopp, J., and MacDonald, H. R. (1998)
136 Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* 28, 540-547
- 137 45. Bleesing, J. J., Morrow, M. R., Uzel, G., and Fleisher, T. A. (2001) Human T cell activation
138 induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is
139 associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* 213, 72-81
- 140 46. Hamad, A. R., Mohamood, A. S., Trujillo, C. J., Huang, C. T., Yuan, E., and Schneck, J. P.
141 (2003) B220⁺ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-
142 independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 171, 2421-2426
- 143 47. Martina, M. N., Noel, S., Saxena, A., Rabb, H., and Hamad, A. R. (2015) Double negative (DN)
144 alphabeta T cells: misperception and overdue recognition. *Immunology and cell biology* 93, 305-
145 310

146

1 **Figure legends**

2 **Figure 1. ATP-mediated cellular responses in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations**

3 Spleen cells from 10-mo-old B6 mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M
 4 ATP for 30 min at 37°C with 5% CO₂, in the presence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were
 5 subsequently stained with fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4 and CD8
 6 or isotype controls as well as fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb and Annexin V fluorescent
 7 probe. Cell debris, dead cells and doublets were gated out. CD62L shedding (A), PS exposure (B),
 8 and pore formation (C) were assessed by flow cytometry on gated CD4⁺ or CD8⁺ CD90⁺B220⁻ T-cell
 9 subpopulations. Flow cytometry histograms obtained with ATP-stimulated CD4⁺ or CD8⁺ T cells are
 10 overlaid on histograms obtained with unstimulated cells. Numbers inside each histogram correspond
 11 to relevant cell percentages in unstimulated/stimulated conditions. At least 20 000 events were
 12 analyzed from each sample. Data are representative of six independent mice per group. For each
 13 cellular activities, the results are also expressed as the mean percentage \pm SEM (n = 6 mice per group)
 14 of CD62L⁺, YO-PRO-3⁺ or Annexin V⁺ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) in the presence (black bars) or
 15 absence (grey bars) of ATP. Asterisks denote statistically significant differences between the
 16 indicated groups (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$).

17

18 **Figure 2. Phenotypic changes of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations with aging**

19 Spleen cells from B6 mice were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic
 20 markers CD90, B220, CD4, CD8, CD45RB, CD44, CD62L, CCR7 and CD127 or isotype controls.
 21 Cell debris, dead cells and doublets were gated out. CD44 versus CD45RB expression was assessed
 22 by flow cytometry on gated CD4⁺ or CD8⁺ CD90⁺B220⁻ T cells from 7-week-old mice (A) and 45-
 23 week-old mice (B). The levels of CD62L, CCR7 and CD127 expression were assessed by flow
 24 cytometry on gated CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve, and CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi}
 25 effector/memory B220⁻CD90⁺ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) (C). Dot plots are representative of six
 26 independent mice per group. At least 20 000 events were analyzed from each sample. The results are
 27 also expressed as the mean percentage \pm SEM (n = 6 mice per group) of CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve, and
 28 CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effectors/memory CD4⁺ (grey bars) or CD8⁺ (black bars) T
 29 cells from 7-week-old mice (A) and 45-week-old mice (B–C). Asterisks denote statistically
 30 significant differences between the indicated groups (*** $p \leq 0.001$).

31

32 **Figure 3. P2X7R membrane expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells during aging**

33 Spleen cells from B6 mice were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic
 34 markers CD90, B220, CD4, CD8, CD45RB and CD44 or isotype controls. Cells debris, dead cells and
 35 doublets were gated out. P2X7R membrane expression on CD4⁺ or CD8⁺ CD90⁺B220⁻ T-cell
 36 subpopulations (either naive or effector/memory) was measured using rabbit polyclonal anti-P2X7R
 37 antiserum (1:100) and fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies. (A–
 38 B) P2X7R-staining histograms of CD4⁺ (grey line) and CD8⁺ (black line) T cells are overlaid on
 39 histograms for T cells stained with secondary antibodies only (pale grey line) from 7-week-old mice
 40 (A) and 45-week-old mice (B). (C–D) P2X7R-staining histograms of CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve, and
 41 CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effectors/memory CD4⁺ (grey line) and CD8⁺ (black line) T
 42 cells are overlaid on histograms for T cells stained with secondary antibodies only (pale grey line)
 43 from 7-week-old mice (C) and 45-week-old mice (D). Histograms are representative of six
 44 independent mice per group. At least 20 000 events were analyzed from each sample. Bar graphs
 45 show mean fluorescence intensity (MFI) ± SEM of P2X7R of 6 individual mice aged 7 weeks (A and
 46 C) or 45 weeks (B and D). Results are expressed as delta MFI ($\Delta\text{MFI} = \text{MFI}_{\text{P2X7R}} - \text{MFI}_{\text{secondary antibody}}$
 47 only). Asterisks denote statistically significant differences between the indicated groups (***) $p \leq$
 48 0.001).

49

50 **Figure 4. ATP-induced Calcium influx in naïve and effector/memory T-cell subsets**

51 Spleen cells from 45-week-old mice were loaded with Fluo-4 AM Ca²⁺ indicator and stained
 52 with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8, CD45RB and
 53 CD44 or isotype controls. Cells debris, dead cells and doublets were gated out. Spleen cells were
 54 then stimulated with 500 μM ATP (arrows in plots) and changes in MFI of Fluo-4 AM overtime in
 55 CD8⁺ T cells (A) and CD4⁺ T cells (B) CD90⁺B220⁻ T-cell subsets (either CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve or
 56 CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory) were measured by flow cytometry. ATP-
 57 induced calcium influx was evaluated at low (0.42 mM) and high (1.42 mM) extracellular calcium
 58 concentrations. The competitive P2X7R antagonist A438079 was added before the stimulation with
 59 ATP (+A438079) to confirm the involvement of P2X7 in ATP-induced calcium influx in T-cell
 60 subsets. The results are also expressed as the fold increase in MFI of Fluo-4 AM overtime in naïve as
 61 well as T_{EM} and T_{CM} CD8⁺ (A) and CD4⁺ (B) T cell subsets stimulated with 500 μM ATP (○) or
 62 pretreated with antagonist A438079 before the stimulation with ATP (●). Asterisks denote
 63 statistically significant differences between the indicated groups (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$).

64

65 **Figure 5. ATP-mediated cellular responses in naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell** 66 **subsets**

67 Spleen cells from 45-week-old mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M
 68 ATP for 30 min at 37°C with 5% CO₂, in the presence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were
 69 subsequently stained with fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8,
 70 CD45RB and CD44 or isotype controls as well as fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb and
 71 Annexin V probe. Cells debris, dead cells and doublets were gated out. CD62L shedding (A), PS
 72 exposure (B), and pore formation (C) were assessed by flow cytometry on gated CD44^{lo}CD45RB^{hi}
 73 naïve, CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory CD90⁺B220⁻ T cells (either CD4⁺ or
 74 CD8⁺). Bar graphs show the mean percentage \pm SEM (n = 6 mice per group) of CD62L⁺, YO-PRO-3⁺
 75 or Annexin V⁺ cells in the presence (black bars) or absence (grey bars) of ATP. Asterisks denote
 76 statistically significant differences between the indicated groups (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$).

77

78 **Figure 6. ATP-induced cell death in naïve and effector/memory T-cell subsets**

79 Spleen cells from 45-week-old mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M
 80 ATP for 2 h. Cells were subsequently stained with fluorescent mAbs against phenotypic markers
 81 CD90, B220, CD4, CD8, CD45RB and CD44 or isotype controls as well as Annexin V probe, and
 82 analyzed by flow cytometry. Cell morphology (FSC/SSC) and Annexin V staining were used to
 83 quantify dead/dying cells (Annexin V⁺ FSC^{lo}SSC^{hi}) within (A) the whole CD4⁺ and CD8⁺ T cells
 84 subpopulations as well as in (B) gated CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve, and CD44^{hi}CD45RB^{lo} and
 85 CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory CD90⁺B220⁻ T-cell subsets (either CD4⁺ or CD8⁺). Results are
 86 expressed as the mean percentage \pm SEM (n = 6 mice per group) of dead cells in the presence (black
 87 bars) or absence (grey bars) of ATP. Asterisks denote statistically significant differences between the
 88 indicated groups (*** $p \leq 0.001$).

89

90 **Supplementary Figures**

91 **Figure 1S. (A) Representative dot plots showing sequential gating for analyses of cell death in T-**
 92 **cell subpopulations.** Spleen cells from B6 mice were stained with either fluorescent mAbs against
 93 phenotypic markers CD90, B220, CD4, and CD8 or isotype controls, and analyzed by flow cytometry.
 94 (A) FSC vs. SSC dot plots were used to select single, viable cells (FSC^{hi}SSC^{lo}) and exclude debris,
 95 dead cells (FSC^{lo}SSC^{hi}) and doublets (FSC-H vs. FSC-A). CD90 vs. B220 dot plot was used to select
 96 B220⁻CD90⁺ T cells in the FSC^{hi} SSC^{lo}-gated cell population. The CD90⁺B220⁻ T cells were then
 97 further gated by the expression of CD4 or CD8. At least 20 000 events were analyzed from each
 98 sample. Data are representative of at least ten independent experiments with 6 mice per group per
 99 experiment. (B) **Increase in cytosolic calcium mediated by ATP and Thapsigargin in T cells.**
 100 Spleen cells from 45-week-old mice were loaded with Fluo-4 AM Ca²⁺ indicator and stained with

101 either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90 and B220, or isotype controls. Spleen cells
 102 were then stimulated with 500 μ M ATP in first step and with 3 μ M Thapsigargin in a second step, and
 103 changes in MFI of Fluo-4 AM overtime in CD90⁺B220⁻ T cells were measured by flow cytometry.

104

105 **Figure 2S. ATP-induced cellular responses in naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell**
 106 **subsets**

107 Spleen cells from 45-week-old mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μ M
 108 ATP for 30 min at 37°C with 5% CO₂, in the presence of YO-PRO-3 fluorescent probe. Cells were
 109 subsequently stained with fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8,
 110 CD45RB and CD44 or isotype controls as well as fluorescent-conjugated anti-CD62L mAb and
 111 Annexin V probe. CD62L shedding, PS exposure, and pore formation were assessed by flow
 112 cytometry on gated CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve (A), CD44^{hi}CD45RB^{lo} (B) and CD44^{hi}CD45RB^{hi} (C)
 113 effector/memory CD90⁺B220⁻ T cells (either CD4⁺ or CD8⁺). Flow cytometry histograms obtained
 114 with ATP-stimulated T cells (black line) are overlaid on histograms obtained with unstimulated cells
 115 (grey line). Numbers inside each histogram correspond to relevant cell percentages in
 116 unstimulated/stimulated conditions. At least 20 000 events were analyzed from each sample. Data are
 117 representative of 6 independent mice per group.

118

119 **Figure 3S. CD39 and CD73 expression on naïve and effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell**
 120 **subsets**

121 Spleen cells from B6 mice were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic
 122 markers CD90, B220, CD4, CD8, CD45RB, CD44, CD39 and CD73 or isotype controls. FSC vs.
 123 SSC dot plots were used to select single, viable cells and exclude debris, dead cells and doublets.
 124 CD44 versus CD45RB expression was assessed by flow cytometry on gated CD4⁺ or CD8⁺
 125 CD90⁺B220⁻ T cells from 45-week-old mice. CD39 and CD73 membrane expression was measured by
 126 flow cytometry on CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve and CD44^{hi}CD45RB^{lo} and CD44^{hi}CD45RB^{hi}
 127 effector/memory CD4⁺ or CD8⁺ T-cell subsets. (A–B) Bar graph shows mean fluorescence intensity
 128 (MFI) \pm SEM of nucleotidases CD39 and CD73 of 6 individual mice. Results are expressed as delta
 129 MFI (Δ MFI = MFI_{CD39 or CD73} – MFI_{isotype control}). Asterisks denote statistically significant differences
 130 between the indicated groups (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Figure 1

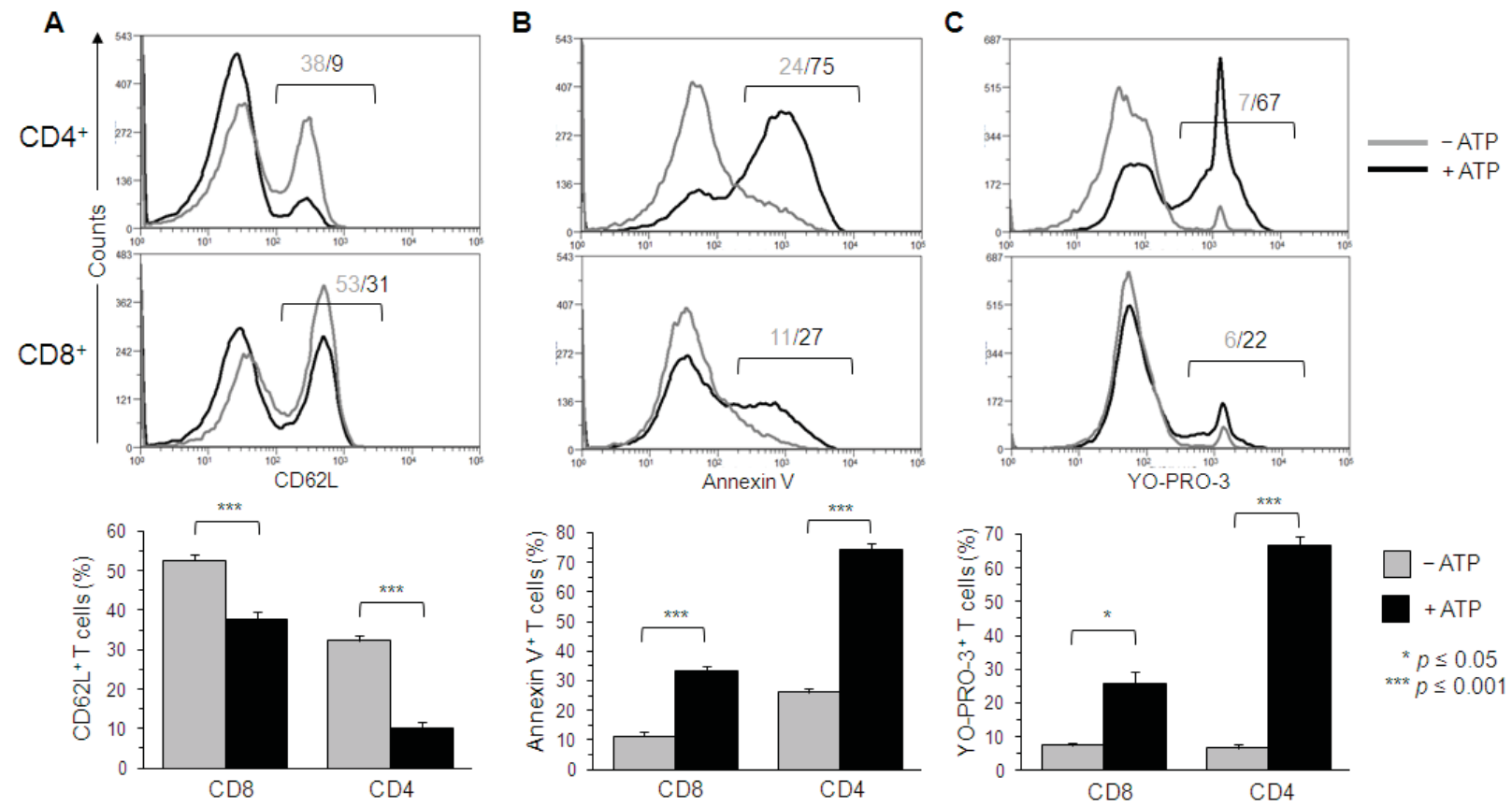


Figure 1

Figure 2

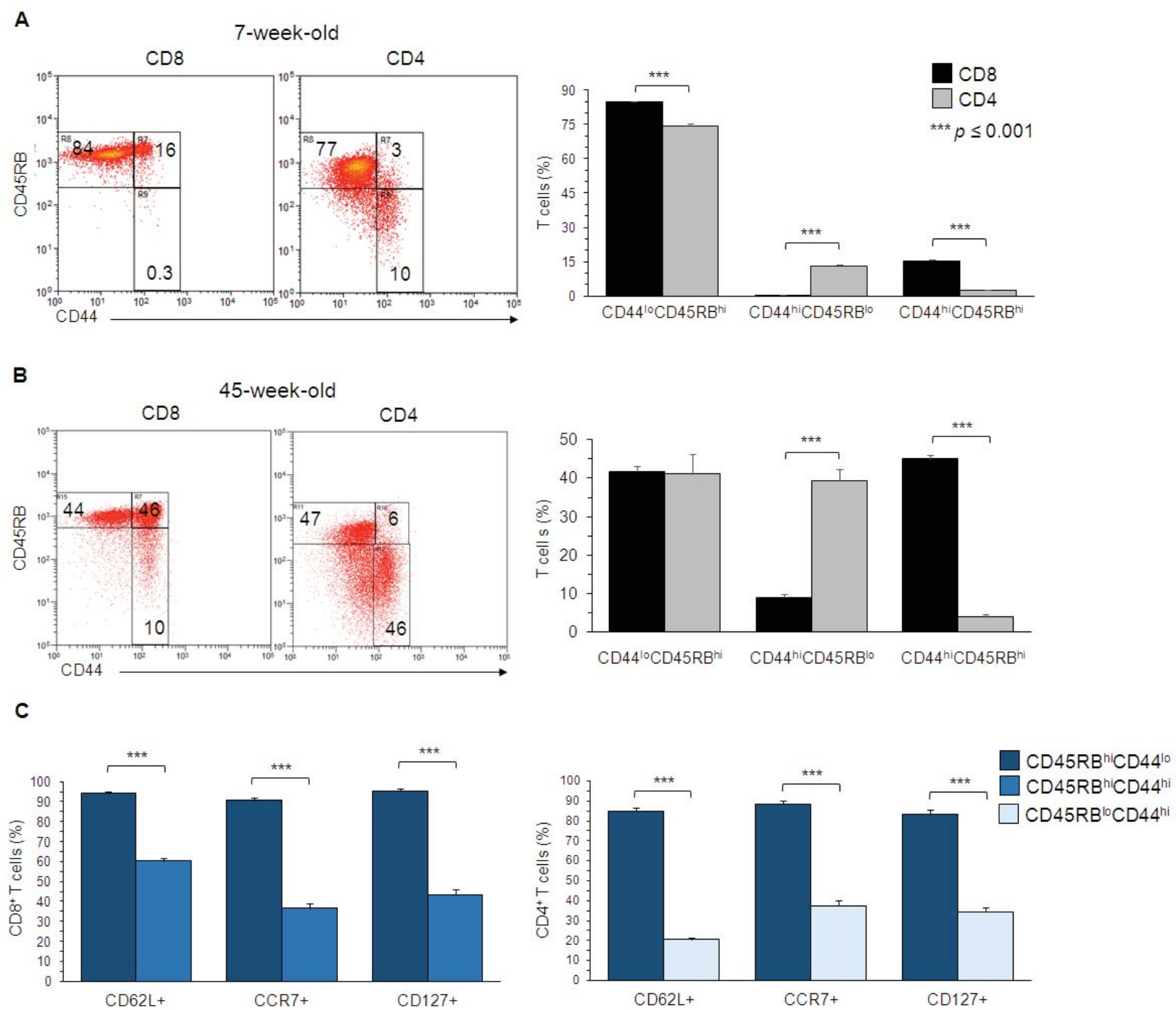


Figure 2

Figure 3

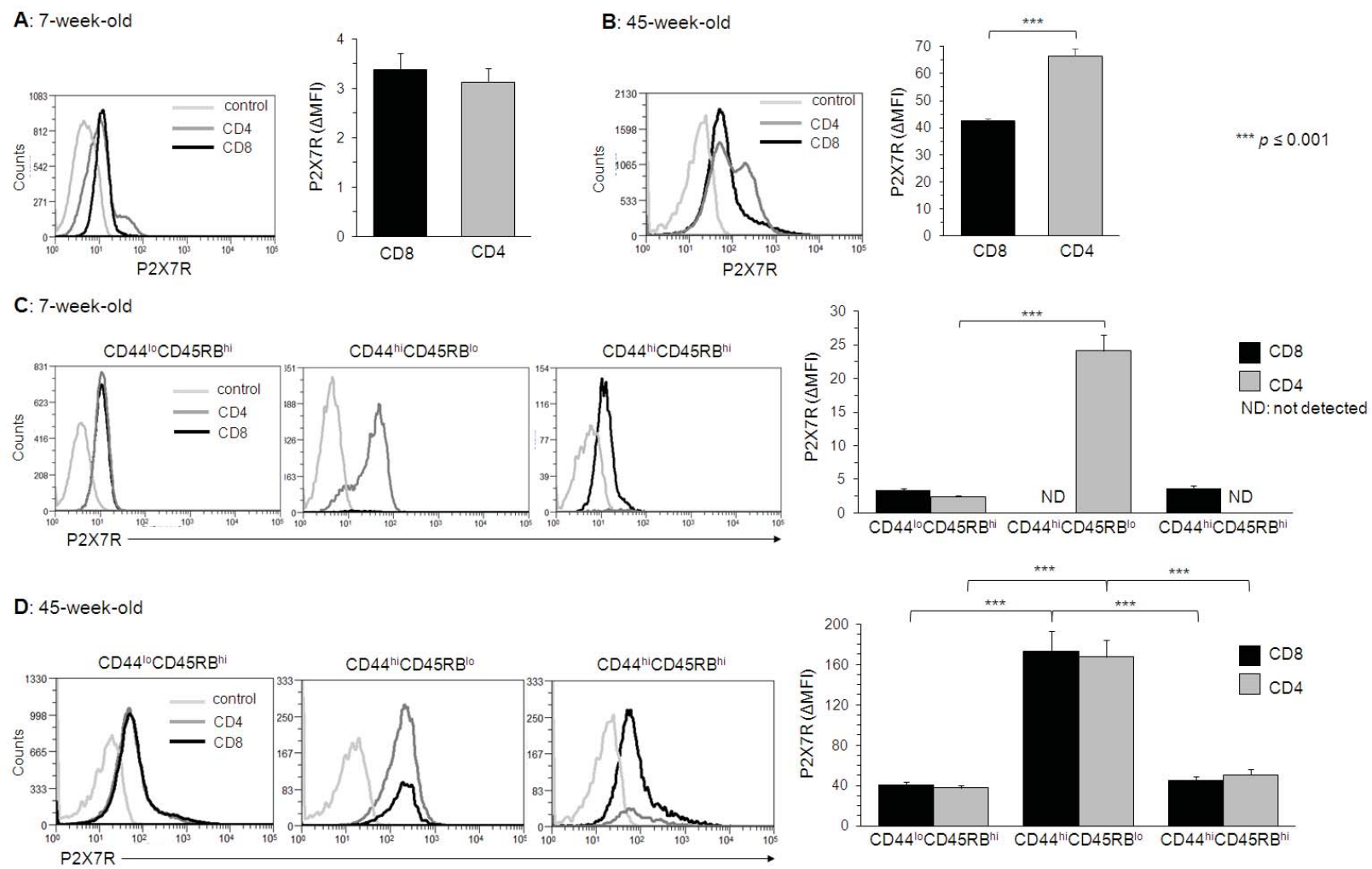
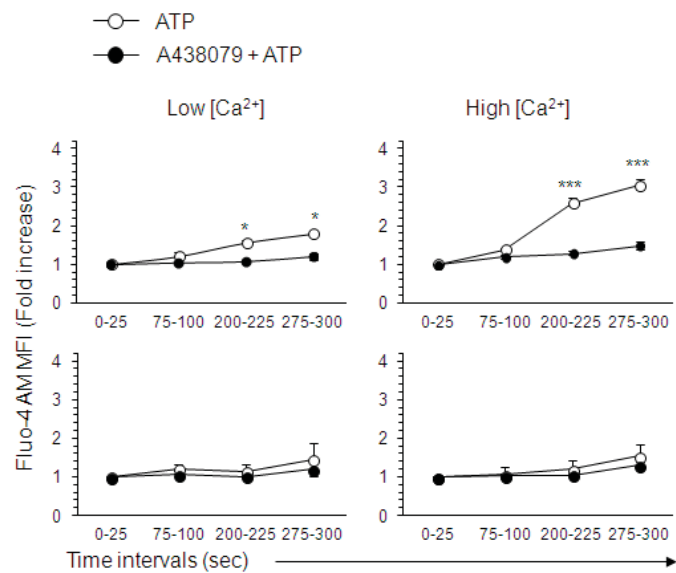
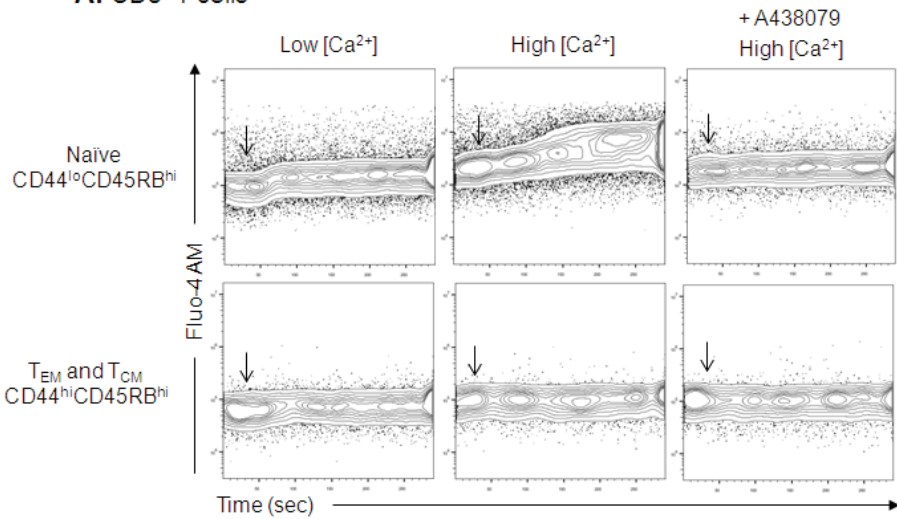


Figure 3

Figure 4

A: CD8⁺ T cells



B: CD4⁺ T cells

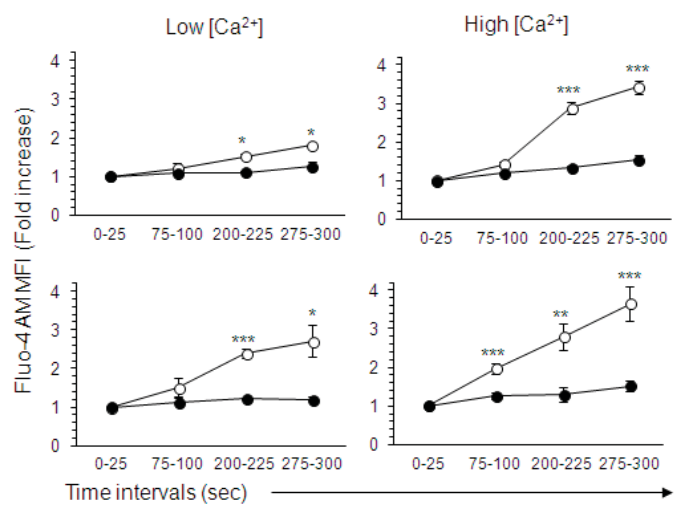
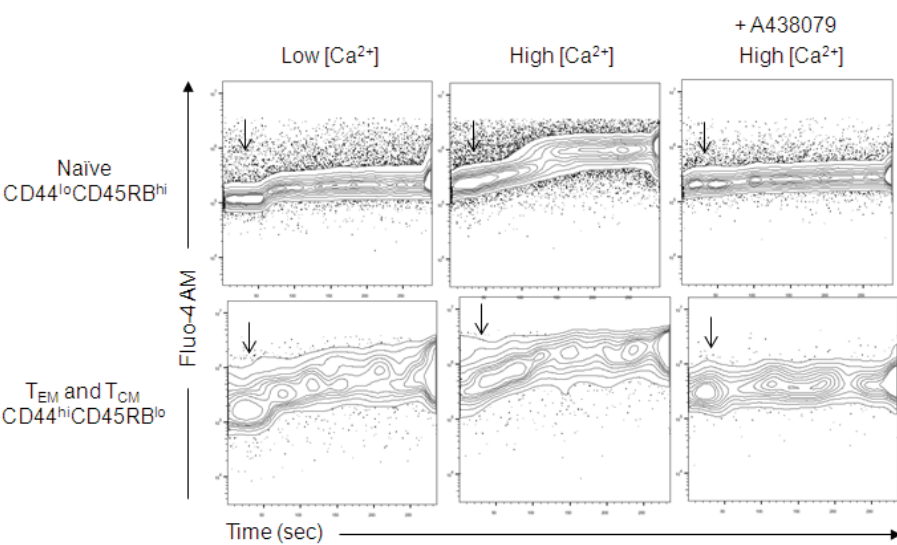


Figure 4

Figure 5

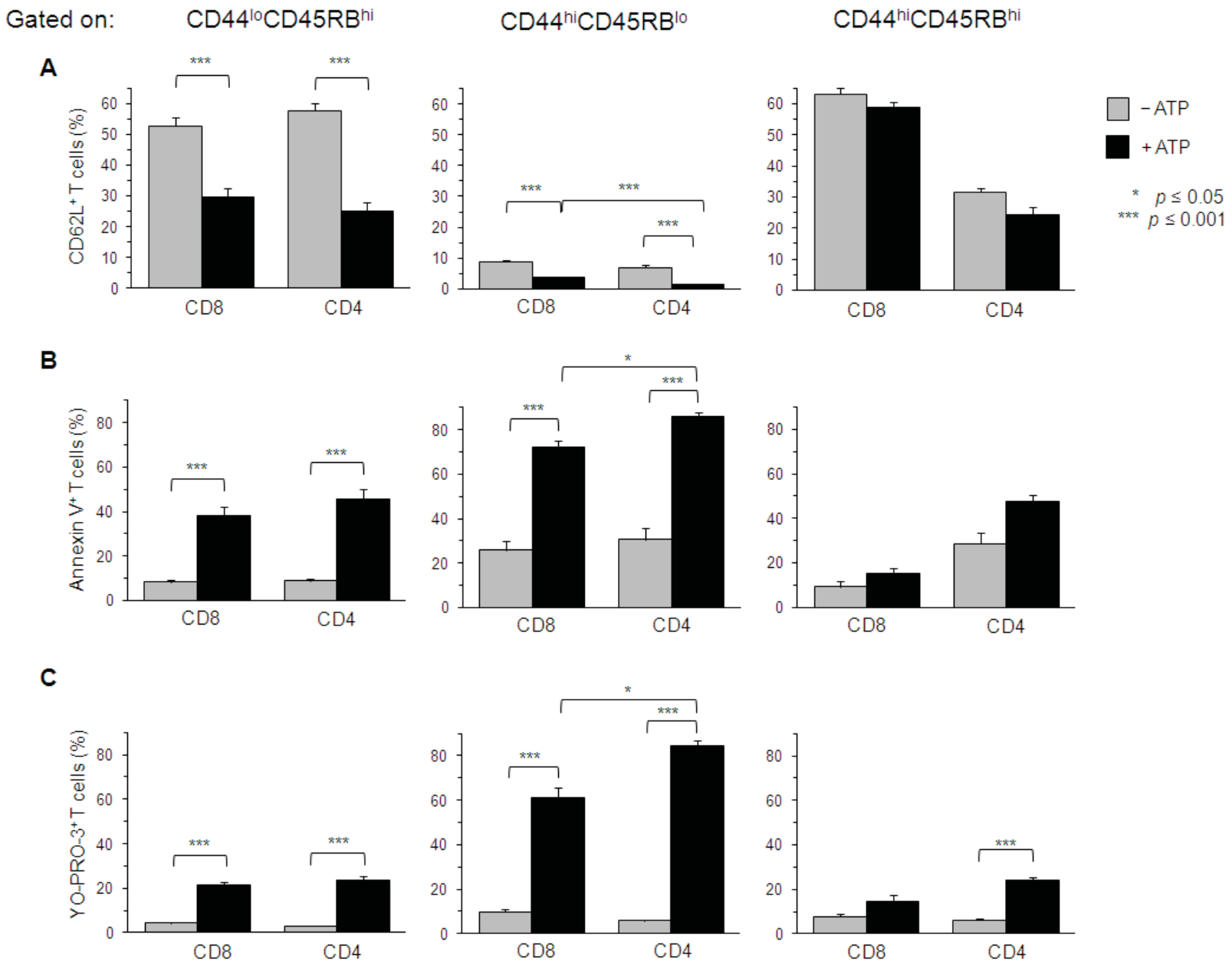
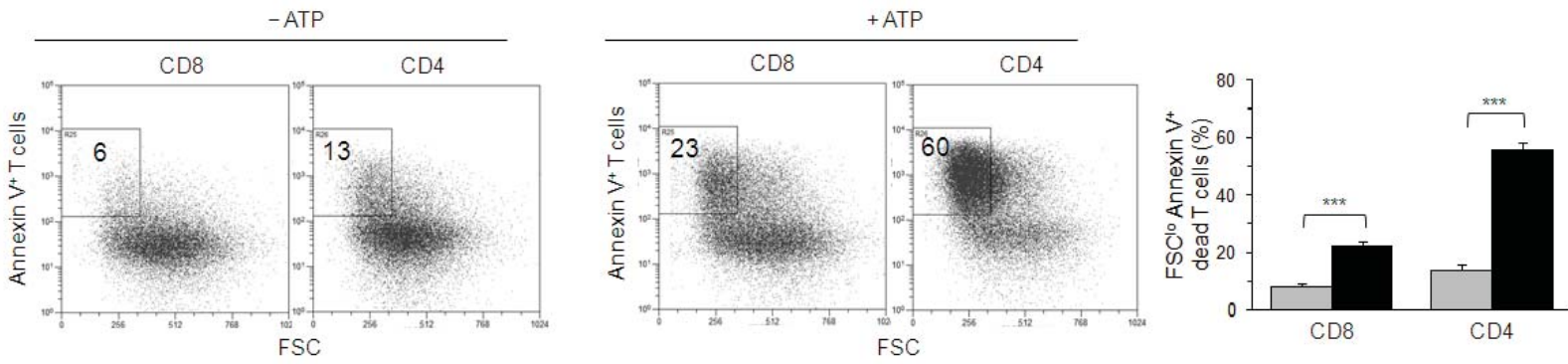


Figure 5

Figure 6

A



B

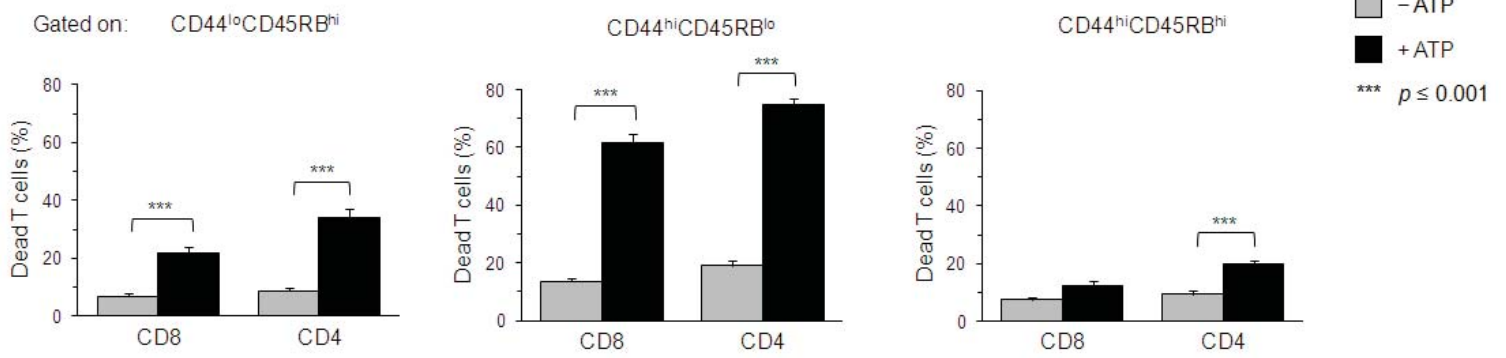


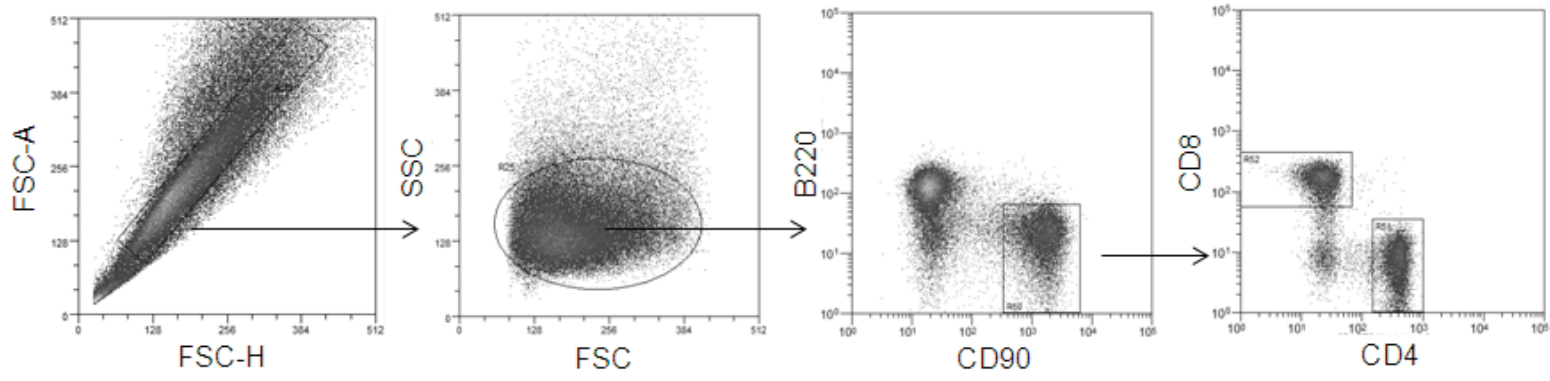
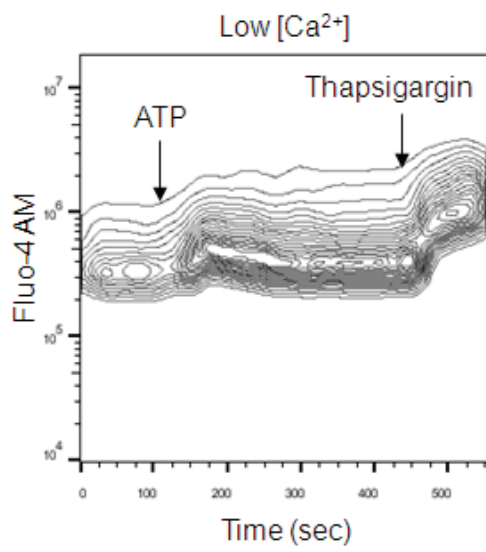
Figure 6

Table 1. Summary of P2X7R expression and functions in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets within aging

	CD4 ⁺ T cells			CD8 ⁺ T cells		
	CD45RB ^{hi} CD44 ^{lo}	CD45RB ^{lo} CD44 ^{hi}	CD45RB ^{hi} CD44 ^{hi}	CD45RB ^{hi} CD44 ^{lo}	CD45RB ^{lo} CD44 ^{hi}	CD45RB ^{hi} CD44 ^{hi}
Numbers at 2-mo-old*	74.4 ± 1	13.3 ± 0.3	2.6 ± 0.1	84.6 ± 0.4	0.4 ± 0.02	15.5 ± 0.4
Numbers at 10-mo-old*	46.1 ± 5	39.4 ± 1	2.9 ± 0.5	41.7 ± 1.3	8.9 ± 0.9	44.9 ± 1
CD39 or CD73 expression	+	+++	+	+	+++	+
P2X7R expression	+	+++	+	+	+++	+
Ca ²⁺ influx	+	+++	ND	+	ND	-
CD62L shedding	+++	+++	-	+++	+++	-
Pore formation	+	+++	+	+	+++	-
PS exposure	+	+++	-	+	+++	-
Cell death	+	+++	+	+	+++	-

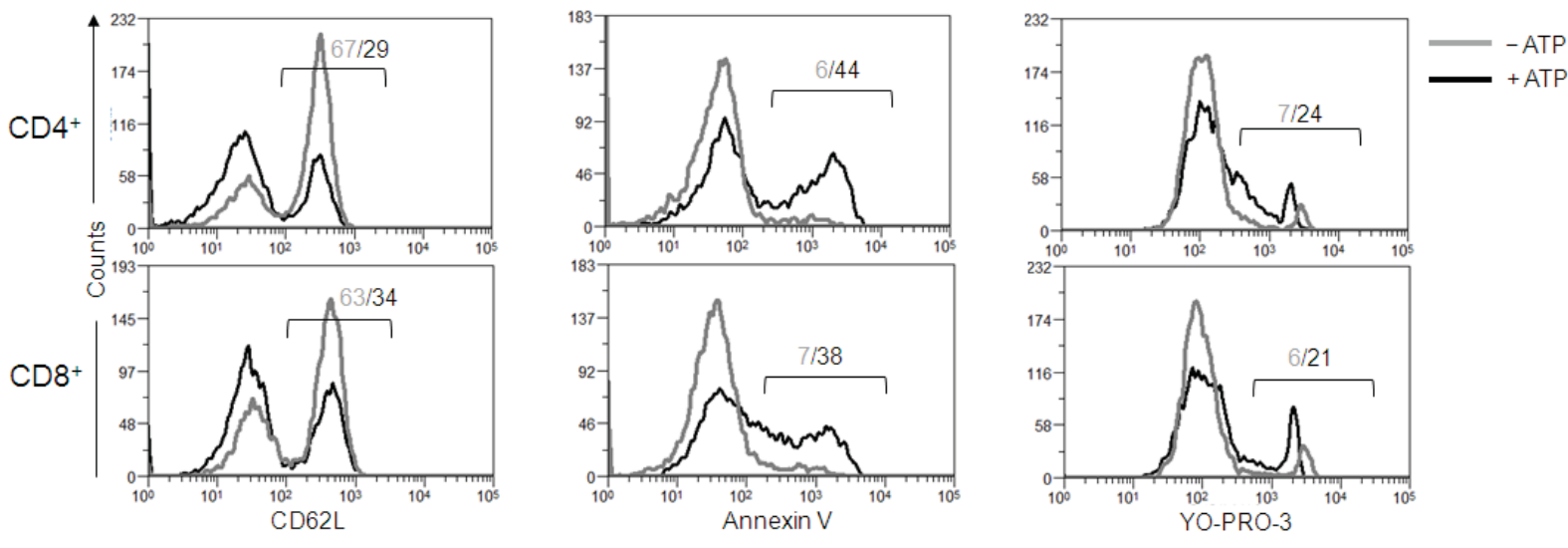
* percentages

ND: not determined

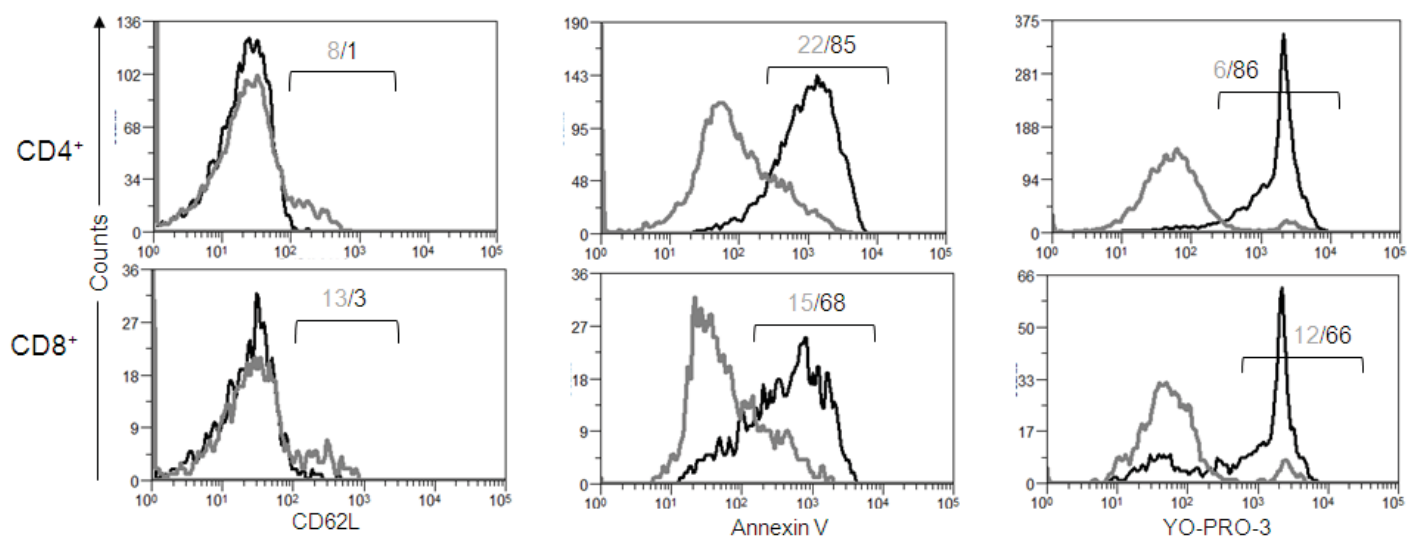
A**B**

Supplementary Figure 1

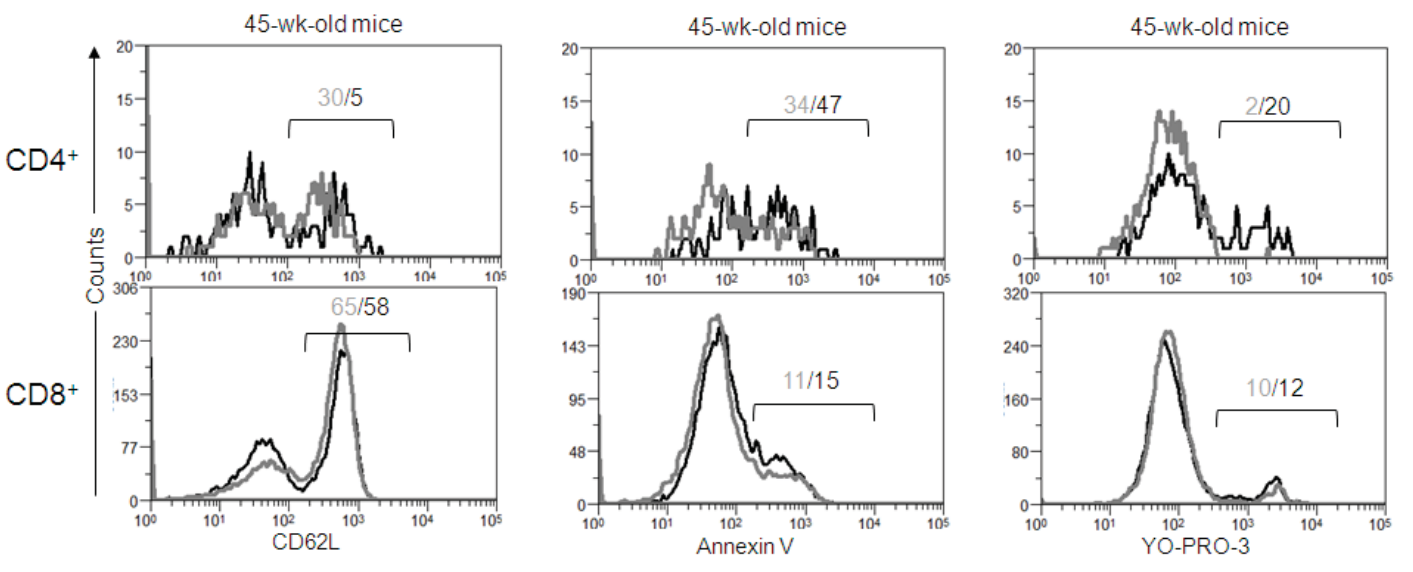
A: gated on CD44^{lo}CD45RB^{hi}



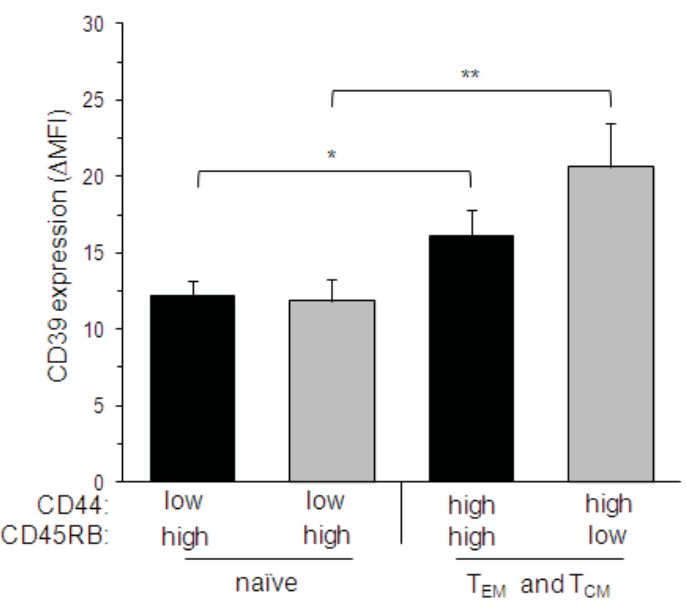
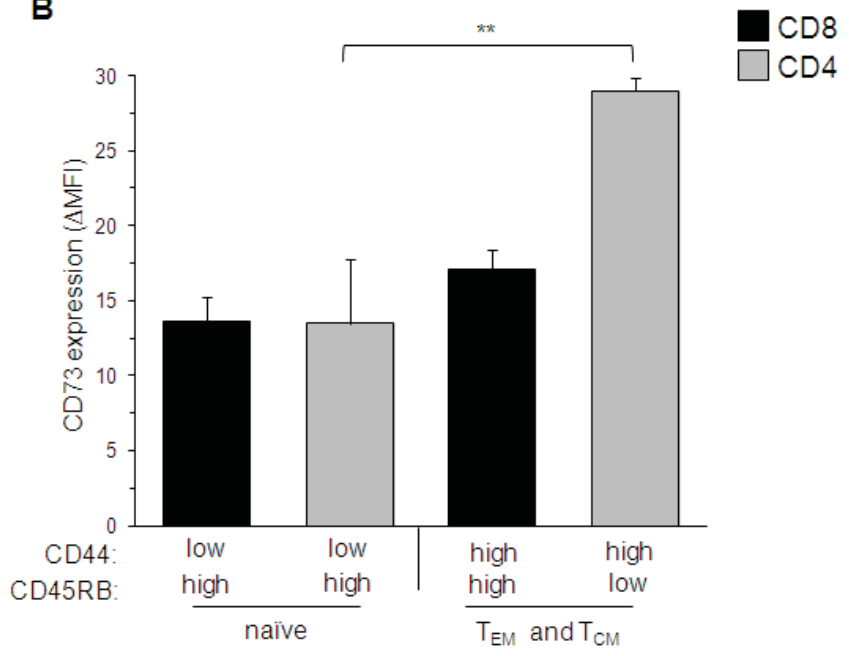
B: gated on CD44^{hi}CD45RB^{lo}



C: gated on CD44^{hi}CD45RB^{hi}



Supplementary Figure 2

A**B**

Supplementary Figure 3

.III A novel mouse model of autoimmune and lymphoproliferative syndrome reveals a synergistic role of death receptor Fas and purinergic receptor P2X7 in T cell homeostasis

Amine Mellouk, Julie Legrand, Hanaa Safya, Mohcine Benbijja, Jean M Kanellopoulos, Karim Benihoud and Pierre Bobé.

Manuscrit en préparation

Résumé

Dans cette étude nous avons évalué l'implication du récepteur purinergique P2X7 (P2X7R) dans les processus physiopathologiques à l'œuvre dans développement des maladies auto-immunes de type lupique. Les souris MRL/*lpr*, déficientes en récepteurs d'apoptose Fas (mutation *lpr*), développent spontanément un lupus érythémateux systémique suite à l'accumulation de lymphocytes T pathogéniques CD4⁻CD8⁻ (DN) B220⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. Nous avons observé précédemment que ces lymphocytes T ont également un déficit d'expression membranaire de P2X7R. Ceci nous a amené à postuler que P2X7R pourrait jouer un rôle clef dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement du lupus. Nous avons donc produit des souris C57BL/6J (B6) déficientes simultanément pour les récepteurs Fas (*lpr*) et P2X7 (P2X7KO). Les souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent une accumulation massive de lymphocytes T DN B220⁺ et des titres très élevés en auto-anticorps et en cytokines proinflammatoires ce qui n'est pas le cas pour les souris B6 simples mutantes *lpr* ou P2X7KO confirmant, pour la première fois, l'implication de P2X7R dans l'homéostasie des lymphocytes T en synergie avec le récepteur Fas. Les lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ responsables de la lymphoaccumulation proviennent majoritairement de la sous-population des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires. Leur phénotype CD44^{high}CD45RB^{high} pourrait correspondre au stade de différenciation CD8⁺ EMRA chez l'Homme. La forte inflammation présente chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO induit une activation chronique des populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ conduisant à l'accumulation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de phénotype effecteur/mémoire EM et CM. Cependant, les réponses cellulaires et humorales dirigées contre les antigènes d'un vecteur adénoviral codant l'ovalbumine sont plus faibles dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO que dans les souris simples mutantes. En conclusion, la lignée de souris B6/*lpr*-P2X7KO reproduit plusieurs aspects de la pathologie des souris MRL/*lpr* ce qui confirme notre hypothèse sur l'implication de P2X7R dans l'homéostasie des lymphocytes T et dans le développement du lupus.

1 **A novel mouse model of autoimmune and lymphoproliferative syndrome**
2 **reveals a synergistic role of death receptor Fas and purinergic receptor**
3 **P2X7 in T cell homeostasis**

4
5 Amine Mellouk¹, Julie Legrand², Hanaa Safya¹, Mohcine Benbijja², Jean M Kanellopoulos⁴,
6 Karim Benihoud⁵ and Pierre Bobé^{1,2}

7
8 ¹ INSERM, Université Paris-Sud, UMR1174, 91405 Orsay, France,

9 ² CNRS, Université Paris-Sud, Institut André Lwoff, 94800 Villejuif, France,

10 ⁴ CNRS, Institut Gustave Roussy, Université Paris-Sud, UMR 8203, 94800 Villejuif, France,

11 ⁵ CNRS, Université Paris-Sud, I2BC, UMR 9198, 91405 Orsay, France

12
13 **Running title:** Fas and P2X7 receptors regulate T-cell homeostasis and autoimmunity

14
15 **Keywords:** Lupus, Inflammation, purinergic, Fas, *lpr* mutation, cell death, T cell, ATP

16 **Correspondence to:** Pierre Bobé; tel.: 331 69 15 75 60; Fax: 331 69 15 58 93; e-mail:
17 pierre.bobe@u-psud.fr

18 **Abbreviations:** DN, Double Negative; extracellular ATP, eATP; P2X7R, P2X7 receptor; SLE,
19 Systemic lupus erythematosus;

20 **Footnote:** This work was funded by grants from ANR – Agence Nationale de la Recherche
21 (ANR-13-ISV6-0003).

1 Abstract

2 The severe autoimmune diseases developed by MRL/*lpr* mice depend on the interaction
3 between the *lpr* mutation of the Fas gene and additional genes of pathologic importance still
4 remain to be discovered in the MRL genetic background. In contrast, C57BL/6 (B6) mice
5 bearing the *lpr* mutation develop only a mild lymphoproliferation and a limited lupus-like.
6 Previously, we have reported that pathogenic B220⁺ CD4⁻CD8⁻ (DN) T cells that accumulate
7 in secondary lymphoid organs of MRL/*lpr* mice during ageing have lost P2X7R membrane
8 expression and ATP sensitivity, suggesting that the ATP/P2X7R pathway could contribute with
9 the Fas pathway to T-cell homeostasis and autoimmunity. Herein, we have generated and
10 characterized a novel mouse strain (called B6/*lpr*-P2X7KO) that harbors homozygous *lpr*
11 mutation and genetic inactivation of P2X7R in the B6 genetic background. In striking contrast
12 to the mild or absent phenotypes observed in B6/*lpr* or B6-P2X7KO mice, B6/*lpr*-P2X7KO
13 mice, especially females, exhibit a severe phenotype characterized by massive hepatomegaly,
14 splenomegaly, and lymphadenopathies. This lymphoproliferative syndrome is caused by the
15 accumulation with ageing of T cells mainly FasL-expressing B220⁺ DN T cells, which most
16 likely originate from CD45RB^{high}CD44^{high} effector/memory CD8⁺ T cells. Moreover, sera from
17 B6/*lpr*-P2X7KO mice contain high levels of IgG anti-dsDNA auto-antibodies and rheumatoid
18 factor as well as chemokines and cytokines. B6/*lpr*-P2X7KO mice have a shortened lifespan,
19 but that remains significantly longer than MRL/*lpr* mice. To conclude, the B6/*lpr*-P2X7KO
20 strain reproduces many aspects of the autoimmune disease of the MRL/*lpr* strain that suggest a
21 synergistic role of the Fas/FasL and ATP/P2X7R pathways in T-cell homeostasis and
22 consequently in autoimmunity.

1 **Introduction**

2 The *Fas^{lpr}* (*lpr*) mutation leads to the accumulation of B220⁺ CD4⁻CD8⁻ (DN) TCRαβ⁺
3 T cells in secondary lymphoid organs responsible of a severe systemic lupus (SLE) and
4 lymphoproliferative syndrome in the MRL/*lpr* mouse strain characterized by lymphadenopathy,
5 splenomegaly, dermatitis, arthritis, arteritis and glomerulonephritis that markedly shorten
6 lifespan. Fas-deficiency results in a massive up-regulation of functional Fas ligand (FasL) on
7 both T and B cells^{1,2}. Since the *lpr* mutation is leaky³, FasL-expressing T and B cells could
8 display cytotoxic activity against Fas⁺ tissues *in vivo*^{4,5}. It is generally considered that B220⁺
9 DN T cells derive from effector CD4⁺ and CD8⁺ single positive T cells that have not undergone
10 activation-induced cell death (AICD) due to the defective *fas* gene⁶⁻⁸. C57BL/6 mice bearing
11 the *lpr* mutation (B6/*lpr*) develop only a mild lymphoaccumulation and a limited lupus-like
12 syndrome^{9,10}, indicating that the *lpr* mutation does not account for the entire autoimmune
13 syndrome of MRL/*lpr* mice and additional genes of pathologic importance still remain to be
14 discovered in the MRL genetic background¹¹. SLE is a complex polygenic autoimmune
15 disease and a large number of susceptibility genes are identified in patients and mouse models
16 of lupus^{12,13}. The purinergic receptor P2X7 (P2X7R) has been suggested as a candidate
17 susceptibility locus for lupus¹⁴⁻¹⁷. However, protective or detrimental effects of P2X7R on
18 autoimmune disease onset and/or development have been observed¹⁸⁻²⁰.

19 The P2X7 receptor (P2X7R) belongs to the P2X receptor family of ATP-gated cation
20 channels. P2X7R plays a major role in both innate and adaptive immunity, such as the
21 maturation of pro-IL-1β and pro-IL-18^{18,21,22}, the proteolytic cleavage of the lymphocyte
22 homing receptor CD62L^{23,24}, and early signaling events that regulate T-cell activation through
23 NF-AT activation and IL-2 production²⁵⁻²⁸. During chronic inflammation, eATP can induce
24 the differentiation of conventional and regulatory CD4⁺ T cells into Th17 cells²⁹⁻³¹. Recently,
25 we have shown that the regulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells sensitivity to eATP is far more

26 complex than previously considered and depends on their stage of activation and differentiation
27 ³² (Mellouk et al manuscript submitted). Moreover, we have reported that effectors B220⁺ DN
28 T cells that accumulate in secondary lymphoid organs of MRL/*lpr* and B6/*lpr* mice have lost
29 P2X7R membrane expression and sensitivity to eATP ³³, suggesting that the ATP/P2X7R
30 pathway could contribute with the Fas apoptotic pathway to T-cell homeostasis. On the B6
31 genetic background, we have therefore generated a novel mouse strain (B6/*lpr*-P2X7KO)
32 harboring deficiency in both Fas and P2X7R pathways. B6/*lpr*-P2X7KO mice develop a
33 massive hyperplasia of spleen and lymph nodes due to the accumulation of FasL-expressing
34 B220⁺ DN T cells. Importantly, lymphoaccumulation is never found in P2X7R-deficient B6
35 mice, suggesting that the P2X7R deficiency massively amplified the mild phenotype associated
36 with the *lpr* mutation in B6 genetic background. High levels of IgG anti-DNA auto-antibodies,
37 rheumatoid factor (RF) and cytokines are found in sera of B6/*lpr*-P2X7KO mice similar to those
38 of MRL/*lpr* mice. In contrast with MRL/*lpr* mice, the liver but not the skin of B6/*lpr*-P2X7KO
39 mice becomes massively infiltrated by leukocytes during ageing. B6/*lpr*-P2X7RKO mice have
40 a shortened lifespan, but that remains significantly longer than MRL/*lpr* mice. Finally, B6/*lpr*-
41 P2X7KO and MRL/*lpr* mice exhibit the same strong sexual dimorphism with female being
42 more severely affected than males. Therefore, our data are consistent with an important role of
43 P2X7R in T-cell homeostasis and autoimmunity development.

1 **Materials and Methods**

2 ***Mice***

3 Fas deficient MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}/J (MRL/*lpr*, stock No. 000485), wild-type MRL/MpJ
4 (MRL+/+, stock No. 000486), wild-type C57BL/6J (B6), P2X7R-deficient B6.129P2-
5 *P2rx7^{tm1Gab}*/J (B6-P2X7KO, stock No. 005576), Fas-deficient B6.MRL-*Fas*^{lpr}/J (B6/*lpr*, stock
6 No. 000482) mice originally from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) were maintained
7 in our animal facilities (CNRS SEAT UPS44, Villejuif, France, and Animalerie NeuroPSI,
8 Orsay, France). The B6 mice homozygous for both *Fas*^{lpr} (*lpr*) mutation and P2X7R-deficiency
9 (B6/*lpr*-P2X7KO) were maintained at CNRS TAAM UPS44 animal facility (Orléans, France).
10 All experiments were conducted in accordance with French (décret n° 2013-118) and EU
11 (directive 86/609/EEC) guidelines for the care of laboratory animals and approved by our local
12 research ethics committee (CEEA 59).

13

14 ***PCR-based genotyping analysis of double-mutant mice***

15 Wild-type and mutant alleles of the *P2X7* and *fas* genes were screened by PCR using
16 DNA extracted from mouse tails and forward 5'-TCACCACCTCCAAGCTCTTC-3' and
17 reverse 5'-TATACTGCCCTCGGTCTTG-3' primers for the *P2X7* gene, forward 5'-
18 GTAAATAATTGTGCTTCGTCAG-3' and reverse 5'-CAAATCTAGGCATTAACAGTG-3'
19 primers for the *fas* gene and forward 5'-GTAAATAATTGTGCTTCGTCAG-3' and reverse 5'-
20 TAGAAAGGTGCACGGGTGTG-3' primers for the early transposon (*ETn*) insertion into the
21 *fas* gene (*lpr* mutation). The PCR conditions were as follows: 1 cycle at 95°C for 5 min
22 followed by 35 cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 30 sec, 72°C for 45 sec and 1 cycle at 72°C
23 for 5 min.

24

25

26

27 *Immunization with ovalbumin-expressing Adenoviral vector*

28 Immunization with ovalbumin (OVA)-expressing adenoviral vector (AdOVA) was
29 performed as previously described ³⁴. Briefly, 10¹⁰ AdOVA particles were injected
30 intraperitoneally. Blood samples were collected before virus injection and at different time
31 points thereafter. As described below, mice were analyzed for the presence of anti-OVA and
32 anti-Ad antibodies as well as OVA-specific CD8⁺ T cells.

33

34 *Isolation of intrahepatic mononuclear cells*

35 Intrahepatic mononuclear cells were isolated as previously described ⁴. Briefly, livers
36 were perfused to eliminate blood, cut into small pieces in 30% fetal calf serum-RPMI 1640
37 medium (Invitrogen, France), passed through a mesh and washed. The cell pellet was
38 resuspended in 20% fetal calf serum-RPMI 1640 medium and mononuclear cells were separated
39 from hepatocytes by Ficoll density (1,090 g/ml) gradient centrifugation.

40

41 *Lymphocyte immunophenotyping and OVA-specific CD8+ T cell frequency*

42 Spleen, lymph node and intrahepatic mononuclear cell suspensions were phenotyped by
43 flow cytometry using fluorescent-conjugated monoclonal antibodies (mAb) against the cell
44 surface markers CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), B220 (clone RA3-6B2), CD45RB (clone
45 C363.16A), CD4 (clone GK1.5), CD8a (clone 53-6.7), CD69 (clone H1.2F3), CD44 (clone
46 IM7), CD62L (clone MEL-14), CD25 (PC61.5), CTLA-4 (clone UC10-4B9), CD197/CCR7
47 (clone 4B12), KLRG1 (clone 2F1), CD127/IL-7 receptor- α (clone A7R34), PD-1 (clone J43),
48 PD-L1 (clone MIH5), Tim3 (clone 2B.2C12), the death-inducing molecules FasL (clone
49 MFL3), Fas (clone 15A7), Granzyme B (clone NGZB) and the transcription factors Foxp3
50 (clone FJK-16s), T-bet (clone 4B10), GATA3 (clone TWAJ), ROR γ t (clone B2D), Bcl-6 (clone

51 BCL-DWN) and Eomes (clone Dan1 1mag) (all from eBioscience, Paris, France). P2X7R was
52 detected using a rabbit polyclonal anti-P2X7R serum described previously 32,33 and
53 fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)'2 secondary antibodies (eBioscience).
54 Fluorescent-conjugated rat or mouse IgG1, IgG2a, IgG2b or Armenian hamster IgG mAbs or
55 rabbit IgG polyclonal serum were used as the isotype control (eBioscience). Use of mAb to
56 mouse Fc γ receptor (clone 93, eBioscience) avoided non-specific antibody binding. The
57 frequency of ovalbumin (OVA)-specific CD8⁺ T cells among splenic T cells was determined
58 using fluorescent-labeled OVA (peptide SIINFEKL)-H-2Kb tetramers and fluorescent mAbs
59 against phenotypic markers, according to the manufacturer instructions (MBL international,
60 Woburn, MA). Data acquisition was performed at the Flow cytometry core facility at I2BC,
61 CNRS UMR 9198.

62

63 *Measurement of antibody responses against OVA-expressing adenovirus*

64 Anti-OVA antibody titers in the sera of mice immunized with AdOVA were determined
65 as previously described ³⁴. Briefly, after coating of 96-well plates (Nunc) with 1 μ g of
66 ovalbumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or 100 ng of denaturated wild-type adenoviral
67 particles, serial dilutions of the sera in 5% milk PBS-Tween were added. Bound antibodies
68 were detected with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Southern
69 Biotechnology Associates, Birmingham, AL). The peroxidase activity was revealed by
70 incubation with the substrate *O*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) for 30
71 min. OD was determined at 490 nm. Titers were defined as the reciprocal of the highest
72 dilution giving an OD₄₉₀ twofold above background values.

73

74

75

76 ***ATP-mediated CD62L shedding, PS exposure and Pore formation assays***

77 P2X7R-mediated cellular functions were performed as previously described 32. Briefly,
78 spleen cells suspended in RPMI 1640 were treated with ATP in a humidified 5% CO₂
79 atmosphere at 37°C for 30 min. Cell suspensions were then washed, and stained for 30 min on
80 ice with phenotype-specific fluorescent mAbs and with fluorescent-conjugated anti-CD62L
81 mAb and Annexin V fluorescent conjugates to assess CD62L shedding and cell surface PS
82 exposure. To quantify P2X7-mediated pore formation, ATP treatment was performed in the
83 presence of YO-PRO-3 fluorescent dyes (Life Technologies, Carlsbad, CA).

84

85 ***ELISA detection of anti-dsDNA autoantibodies and rheumatoid factor***

86 To quantify serum levels of IgG2a anti-dsDNA autoantibody and IgG rheumatoid factor
87 (RF), 96-well plates were coated with 500 ng calf-thymus DNA and 100 ng rabbit IgG (Sigma-
88 Aldrich), respectively. After blocking with 1% BSA, serial serum dilutions (starting at 1/400)
89 were added in triplicate for 2 h at room temperature, and then washed. Bound IgG anti-DNA
90 and RF were detected with alkaline phosphatase-labeled goat anti-mouse IgG and pNPP
91 (Sigma-Aldrich). OD was determined at 405 nm.

92

93 ***Cytokine, chemokine and CRP detection by ELISA and Multiplex immunoassays***

94 Serum levels of cytokines, chemokines and CRP (C-reactive protein) were assayed
95 using the ProcartaPlex Multiplex Immunoassays (36-Plex Mouse ProcartaPlex, CRP Mouse
96 ProcartaPlex simplex kit, eBioscience) or Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis,
97 MN), following the manufacturers' instructions.

98

99 ***Histopathology***

100 Kidneys, liver, skin, brain, heart, gut, lungs, thymus, pancreas, spleen and lymph node
101 samples were fixed overnight in Glyo-Fixx (Shandon, Thermo Fisher Scientific, France), then
102 dehydrated, paraffin-embedded and 4- μ m-thick sections were cut. After hematoxylin, eosin
103 and saffron staining, sections were examined. Sections were then counterstained with hemalun.
104

105 *Statistical analysis*

106 Data are reported as mean \pm SE. Experimental and control groups were compared using
107 unpaired two-tailed Student's *t*-test or ANOVA. Statistical significance is indicated as follows:
108 * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

1 **Results**

2 *B6/lpr-P2X7KO mice develop massive hyperplasia of the spleen and lymph nodes*

3 Previously, we have reported that pathogenic B220⁺ DN T cells that accumulate in the
4 spleen and lymph nodes (LN) of MRL/*lpr* or B6/*lpr* mice have lost both sensitivity to eATP
5 and P2X7R membrane expression³³. In order to determine whether the down-regulation of
6 P2X7R expression in B220⁺ DN T cells contributes to their accumulation in *lpr* mice, we
7 generated a B6 mouse strain harboring both the *lpr* mutation and P2X7R deficiency (named
8 B6/*lpr*-P2X7KO). B6 genetic background was chosen because B6/*lpr* develops only a mild
9 lymphoaccumulation compared to MRL/*lpr* mice. The B6/*lpr*-P2X7KO mice were produced
10 by crossing B6/*lpr* and B6-P2X7KO mice and were recovered in the F2 generation with the
11 expected Mendelian genotype frequencies. PCR analysis of genomic DNA was used to select
12 double-mutant mice among F2 generation mice (supplementary Fig. 1A). The absence of
13 P2X7R and Fas membrane expression on B6/*lpr*-P2X7KO spleen cells was confirmed by flow
14 cytometry using a rabbit polyclonal antiserum against P2X7R and anti-Fas mAb, respectively
15 (supplementary Fig. 1B). The absence of P2X7R was also confirmed by the loss of ATP-
16 induced CD62L shedding, PS externalization and pore formation in B6/*lpr*-P2X7KO spleen
17 cells (supplementary Fig. 1C).

18 The B6/*lpr*-P2X7KO mouse strain, but not the parent strains B6/*lpr* and B6-P2X7KO
19 develop an unexpected massive hyperplasia of peripheral lymphoid organs with aging of similar
20 magnitude to the one observed MRL/*lpr* mice (Figs 1A–1B). The weights of the spleen and
21 LNs from 6-month-old B6/*lpr*-P2X7KO mice were similar to those of 4-month-old MRL/*lpr*
22 mice, but 4 to 6 times higher than those from 6-month-old B6/*lpr* mice (Table 1). In B6/*lpr*-
23 P2X7KO spleens and LNs, leukocyte cell numbers were increase of around 2 to 3 times (Fig.
24 1B and data not shown), mainly due to the accumulation of T cells (Fig. 1C and supplementary
25 Fig. 1A). Though absolute numbers of B cells were unchanged in B6/*lpr*-P2X7KO mice and

26 similar to those of MRL/*lpr* mice or parental strains, their percentages were drastically reduced
27 due to the massive increase in T cell numbers (Fig. 1C and supplementary Fig. 1A).

28

29 *Massive accumulation of B220⁺ DN T cells in B6/*lpr*-P2X7KO spleen and lymph nodes*

30 Given that the main T cell subset that accumulates in secondary lymphoid organs of
31 autoimmune MRL/*lpr* expresses the B220⁺ DN phenotype, we have analyzed the levels of CD4,
32 CD8 and B220 membrane expression in T cells from B6/*lpr*-P2X7KO spleen (Figs. 2 and 3)
33 and LNs (supplementary Fig. 2) by flow cytometry. A significant increase of the absolute
34 numbers of CD4⁺ (Fig. 2B) and CD8⁺ T cells (Fig. 2C) and DN T cells (Fig. 2D) was found in
35 the spleen of B6/*lpr*-P2X7KO mice. However, while the percentages of CD4⁺ T cell were
36 unchanged among the whole splenic T-cell population (Figs. 2B–2E), they were significantly
37 decreased for CD8⁺ T cells (Figs. 2C–2E) and increased for DN T cells (Figs. 2D–2E),
38 suggesting that DN T cells could originate from the CD8⁺ subpopulation. Importantly, all DN
39 T cells from B6/*lpr*-P2X7KO spleen express the membrane phosphatase B220 (Fig. 3),
40 suggesting their similar origin with their counterparts from MRL/*lpr* mice. Similar proportions
41 of CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ DN T-cell subsets were found in LNs of B6/*lpr*-P2X7KO mice
42 (supplementary Figs. 2A–2B). Like in the MRL/*lpr* mouse strain, the numbers of B220⁺ DN T
43 cells in B6/*lpr*-P2X7KO mice are significantly higher in female than male. As expected, less
44 than 5% of B220⁺ DN T cells were found in the spleen and LNs of B6 and B6-P2X7KO mice,
45 whatever their age and gender (Fig. 2 and supplementary Fig. 2).

46

47 *Kinetics of B220⁺ DN T cells accumulation in B6/*lpr*-P2X7KO mice*

48 Macroscopically, adenopathies develop later in B6/*lpr*-P2X7KO mice than in MRL/*lpr*
49 mice, suggesting that the time scale of lymphoaccumulation differs between the two mouse
50 strains. Therefore, we monitored the accumulation of B220⁺ DN T cells accumulation in LNs

51 from newborn to 32 weeks-old mice (Fig. 3D). In 10 weeks-old mice, B220⁺ DN T cells
52 represent almost 40% of whole T cells in MRL/*lpr* mice, whereas around 12% were found in
53 B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice. In B6/*lpr* mice, B220⁺ DN T cell numbers reached a plateau
54 (20% of whole T cells, Fig. 3D) at the age of 15 weeks. In contrast, in B6/*lpr*-P2X7KO mice
55 the numbers of B220⁺ DN T cells continue to increase and reached the numbers observed in
56 MRL/*lpr* mice at the age of 30 weeks (Fig. 3D). To resume, our data show that the maximum
57 accumulation of B220⁺ DN T cells in the spleen and LNs was significantly higher in B6/*lpr*-
58 P2X7KO mice than in B6/*lpr* mice, and similar to MRL/*lpr* mice. However, twice as much
59 time is necessary in B6/*lpr*-P2X7KO mice to reach B220⁺ DN T cell numbers observed in
60 MRL/*lpr* mice. All together, our data strongly suggest that the *lpr* and *p2rx7KO* mutations
61 synergize to amplify the lymphoproliferative syndrome.

62

63 *Livers of B6/lpr-P2X7RKO mice are infiltrated by B220⁺ DN T cells*

64 MRL/*lpr* mice develop autoimmune syndrome characterized by T-cell infiltrations in
65 multiple organs, excepted in the liver³⁵. In contrast, histology analysis of B6/*lpr*-P2X7KO
66 organs revealed numerous infiltrates in the liver and to a lesser extent kidney, but not in other
67 organs (Fig. 4A). Livers from 4 to 8 month-old mice were collected and weighted. Mean
68 B6/*lpr*-P2X7KO liver weights were significantly higher than B6/*lpr* and B6-P2X7KO values
69 (Table 1). Liver mononuclear cells were isolated and phenotypic analyses were performed by
70 flow cytometry. Surprisingly, numbers of liver infiltrating T cells were significantly higher in
71 B6/*lpr*-P2X7KO mice than B6-P2X7KO, B6/*lpr* and even MRL/*lpr* mice (Fig. 4).
72 Interestingly, livers from B6-P2X7KO mice revealed a massive infiltration of CD4⁺, CD8⁺ and
73 B220⁺ DN T cells. Numbers of B220⁺ DN T cells were 7-fold and 10-fold higher in livers from
74 B6/*lpr*-P2X7KO mice than in MRL/*lpr* and B6/*lpr*, respectively (Fig. 4B). However, levels of

75 C-reactive protein were normal in B6/*lpr*-P2X7KO sera, suggesting that the extent and severity
76 of tissue damage were limited in B6/*lpr*-P2X7KO mice compared to MRL/*lpr* mice (Fig. 4C).

77

78 *Origin of B220⁺ DN T lymphocytes that accumulate in B6/*lpr*-P2X7KO tissues*

79 Figure 2 shows that the decrease in CD8⁺ T cell numbers observed in B6/*lpr*-P2X7KO
80 mice with ageing are counterbalanced by an increase in DN T cell numbers, suggesting that
81 B220⁺ DN T cells could originate from the CD8⁺ subpopulation. To confirm that the CD8
82 originate from B220 DN T cells, we have quantified the levels of CD8 membrane expression
83 in T lymphocyte by flow cytometry (Fig 5A and Supplementary Fig. 2C). In agreement with a
84 CD8 origin of DN T cells, we have found that the levels of CD8 expression, but not CD4 were
85 dramatically decreased on T cells from B6/*lpr*-P2X7KO mice but not B6, B6-P2X7KO or
86 MRL/*lpr* mice (Fig. 5A). In B6/*lpr* mice, we have observed a slight decrease of CD8 expression
87 levels on T cells (Fig. 5A). Moreover, we found increased expression (MFI) of Eomesodermin
88 (Eomes), a CTL- and Th1-specific transcription factor, and percentages of Eomes⁺ T cells in
89 the CD8 subpopulation from B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice compared to B6 and B6-
90 P2X7KO mice, suggesting that CD8⁺ T cells from *lpr* mice exhibited a high level of activation
91 (Fig. 5B). Importantly, high percentages of pathogenic B220⁺ DN T cells from *lpr* mice,
92 especially in B6/*lpr*-P2X7KO mice, expressed high levels (MFI) of Eomes, confirming their
93 CD8 origin (Fig. 5B). Furthermore, the percentages of Eomes⁺CD4⁺ T cells were increased in
94 both B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice compared to B6 and B6-P2X7KO mice, suggesting
95 increased numbers of Th1 lymphocytes in *lpr* mice (Fig. 6B).

96

97

98

99 *High levels of membrane-anchored and soluble form of FasL in B6/*lpr*-P2X7KO mice*

100 To investigate whether B220⁺ DN T lymphocytes could display cytotoxic activities in
101 addition to CD8⁺ cytotoxic T cells, we have quantified the Granzyme B vesicular expression
102 (Fig. 5C) and FasL membrane expression (Fig. 5D) on T lymphocytes from 4 to 8 month-old
103 B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice. Interestingly, FasL was overexpressed on T cells from
104 B6/*lpr*-P2X7KO and MRL/*lpr* mice but not B6/*lpr* and B6-P2X7KO mice (Fig. 5D). Moreover,
105 FasL can be also synthesized in soluble form. We found that FasL membrane expression was
106 correlated with high levels of soluble FasL in sera from B6/*lpr*-P2X7KO (Fig. 5D). In contrast,
107 Granzyme B expression was increased in CD8⁺ but not CD4⁺ or B220⁺ DN T cells from B6/*lpr*-
108 P2X7KO mice (Fig. 5C). Interestingly, like in MRL/*lpr* mice¹, B220⁺ DN and CD8⁺ T cells
109 from B6/*lpr*-P2X7KO mice have cytotoxic potential by the Fas/FaL-dependent and Granzyme-
110 dependent pathway, respectively.

111

112 *Central memory and Effector Memory differentiation stages predominate in B6/lpr-P2X7KO*
113 *T-cell subsets.*

114 We show above that B6/*lpr*-P2X7KO mice express with ageing high levels of both pro
115 and anti-inflammatory cytokines as well as high numbers of activated T CD4⁺ (Tconv and
116 Treg), CD8⁺ and B220⁺ DN T lymphocytes. To gain insight into the differentiation state of
117 B6/*lpr*-P2X7KO T cells, we have assessed precisely their stage of differentiation using a more
118 detailed phenotypic characterization (Fig. 6 and Supplementary Fig. 3). The results show that
119 the percentages of CD44^{lo}CD62L⁺ naïve T cells (either CD4⁺ or CD8⁺) decreased in B6/*lpr* and
120 B6/*lpr*-P2X7KO with ageing compared to B6 and B6-P2X7KO mice because they acquired
121 either a CD44^{hi}CD62L⁻CCR7⁻ effector memory (EM) phenotype or a CD44^{hi}CD62L⁺ CR7⁺
122 central memory (CM) phenotype (Supplementary Fig. 3A and 3B). Pathogenic CCR7⁻B220⁺
123 DN T cells expressed also the EM or CM phenotype (Supplementary Fig. 3C). Recently, we
124 have shown that the effector/memory CD8⁺ and CD4⁺ subpopulations from wild-type B6 mice

125 mainly expressed the CD44^{hi}CD45RB^{hi} or CD44^{hi}CD45RB^{lo} phenotype, respectively (Mellouk
126 et al manuscript submitted). Therefore, we have analysed CD44 and CD45RB expression on T
127 lymphocytes from B6, B6-P2X7KO, B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice. In agreement with our
128 previous results, we found with ageing a decrease of the percentages of CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve
129 T cells and a compensatory increase of the percentages of CD44^{hi}CD45RB^{hi} or
130 CD44^{hi}CD45RB^{lo} effector/memory T cells in both B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mouse strains
131 (Fig. 6A). Almost all pathogenic B220⁺ DN T-cell subset expressed a CD44^{hi}CD45RB^{hi}
132 effector/memory phenotype (Fig. 6B), confirming their CD8⁺ origin. Moreover, these results
133 suggest that all T-cell subsets from B6/*lpr*-P2X7KO mice are hyperactivated, which have been
134 evaluated by the analysis of the levels of CD44, CD45RB, PD-1 and Tim3 expression on CD4⁺
135 and CD8⁺ subpopulations (Figs. 6C and 6D). We found a small level of PD-1, but not Tim3
136 membrane expression in CD4⁺ (CD44^{hi}CD45RB^{lo}) and CD8⁺ (CD44^{hi}CD45RB^{hi}) T-cell
137 subpopulations from B6/*lpr*-P2X7KO (Figs. 6C and 6D). In MRL/*lpr* mice, small numbers of
138 CD8⁺ T cells displayed the PD-1⁺Tim3⁺ exhausted phenotype (Fig. 6C). Interestingly, B220⁺
139 DN from B6/*lpr*-P2X7KO mice expressed the CD44^{hi}CD45RB^{hi}CCR7⁻ phenotype reminiscent
140 of the human EMRA phenotype of chronically activated CD8⁺ T lymphocytes.

141

142 *High levels of anti-DNA autoantibodies and rheumatoid factor in B6/lpr-P2X7KO sera*

143 Anti-DNA autoantibodies and RF play an important pathogenic role in SLE through
144 immune complex-mediated damage in kidneys and other organs. Therefore, complement-
145 fixing IgG2a anti-DNA antibodies and IgG RF were quantified by ELISA in sera from 7 to 8
146 month-old B6/*lpr*, B6-P2X7KO, B6/*lpr*-P2X7KO mice and 4 month-old MRL/*lpr* mice. As
147 expected, ELISA analyses revealed pathologic levels of IgG2a DNA-reactive antibodies and
148 IgG RF in sera of B6/*lpr* but not B6-P2X7KO mice (Fig. 7A). Importantly, significantly higher

149 levels of autoantibodies were found in B6/*lpr*-P2X7KO sera compared to B6/*lpr* sera, which
150 were very similar to those found in sera of autoimmune MRL/*lpr* mice (Fig. 7A).

151

152 *High levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines in B6/lpr-P2X7KO sera*

153 Because inflammatory cytokines are major mediators of several autoimmune and
154 inflammatory diseases, we compared their serum levels between B6/*lpr*-P2X7KO and MRL/*lpr*
155 mice (Figs. 7B–D). We found high levels of inflammatory cytokines as well as Th1 and Th17
156 cytokines (*e.g.* IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-23) in B6/*lpr*-P2X7KO sera, whose levels are similar
157 or even higher than those measured in sera from autoimmune MRL/*lpr* mice (Fig. 7B).
158 Interestingly, we found that sera from B6/*lpr*-P2X7KO mice contained also high levels of the
159 Th2-type cytokines IL-4 and IL-5, which are very low in sera from MRL/*lpr* mice (Fig. 7C).
160 Furthermore, we found that B6/*lpr*-P2X7KO sera contained high levels of the Th2 cytokine IL-
161 10 as well as high numbers of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) compared to B6, B6/*lpr*, B6-
162 P2X7KO and even MRL/*lpr* mice (Supp. Fig. 4). These results show that the cytokine profiles
163 expressed by double-mutant B6/*lpr*-P2X7KO mice were very different of single-mutant mice
164 (*i.e.* B6/*lpr* and B6-P2X7KO) and were, although different, at least as complex as those of
165 autoimmune MRL/*lpr* mice.

166

167 *B6/lpr-P2X7KO mice display reduce ability to mount humoral and cellular immune responses*
168 *against OVA-expressing adenoviral vector*

169 To confirm the age-related hyperactivation of the immune system in B6/*lpr*-P2X7KO
170 mice (Figs. 6 and 7), wild-type, single- and double-mutant mice on B6 genetic background have
171 been immunized with OVA-expressing adenoviral vector. Then we have measured the intensity
172 of humoral and cellular immune responses within the first 8 weeks after immunization. Thus,
173 we have quantified percentages and absolute numbers of OVA-specific CD8⁺ T cells by flow

174 cytometry using OVA peptide-H-2K^b tetramer. We found that the percentages and absolute
175 numbers of OVA-specific CD8⁺ T cells are significantly lower in the spleen of B6/*lpr*-P2X7KO
176 mice than B6, B6-P2X7KO and B6/*lpr* mice (Fig. 8A). Despite their CD8 origin and activated
177 status (Figs. 5–6), B220⁺ DN T cells are unable to mount immune responses against OVA-
178 expressing adenoviral vector. Importantly, a single or double deficiency in the *fas* gene (*lpr*
179 mutation) and/or *p2x7* gene (P2X7KO) did not modify the proportions of the distinct subsets of
180 effector CD8⁺ T cells, which include short-lived (SLEC; KLRG1⁺CD127⁻), double-positive
181 (DPEC; KLRG1⁺CD127⁺), memory-precursor (MPEC; KLRG1⁻CD127⁺) effector cells from
182 an early-effector cell (EEC, KLRG1⁻CD127⁻) (Fig. 8B). In contrast, in the CD4 subpopulation,
183 we observed a significant decrease of the percentages of Th1 (T-bet⁺) and Th2 (GATA3⁺) cells
184 in B6/*lpr*-P2X7KO mice (Fig. 8C), which are consistent with the decrease of the humoral
185 responses against the adenoviral vector (Figs. 8D and 8E). Anti-Ad IgG1, IgG2a and IgG2b
186 antibody titers as well as anti-OVA IgG antibody titers were significantly lower in sera from
187 B6/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice than B6 and B6-P2X7KO mice (Fig. 8D, and data not shown).
188 Altogether these results reveal a reduce efficacy of the immune system of B6/*lpr*-P2X7KO mice
189 to response to an antigenic challenge, which could be due to an hyperactivation of the T-cell
190 subpopulations as well as their late stage of cellular differentiation.

1 Discussion

2 SLE is a multifactorial autoimmune disease characterized by the hyperactivation of
3 immune cells, production of autoantibodies, and immune complex-mediated inflammatory
4 damage in multiple organs. The etiology of the SLE results from a combination of genetic,
5 hormonal and environmental factors. The contributing genetic factors are believed to be
6 multiple susceptibility alleles with only a small individual contribution to disease. Mouse
7 models of lupus have allowed the identification of numerous susceptibility loci as well as a
8 better understanding of molecular and cellular mechanisms involved in the onset and
9 development of the disease^{13,36,37}. Mouse models are also essential for the development of
10 novel SLE therapy such as the As₂O₃-based treatment that we have developed using MRL/*lpr*
11 mice³⁵.

12 Since P2X7R plays a major role in both innate and adaptive immunity, its involvement in
13 the development of inflammatory and autoimmune diseases is extensively studied. Moreover,
14 the ATP/P2X7R pathway has been suggested as a candidate susceptibility locus for lupus¹⁴⁻¹⁷.
15 However, protective or detrimental effects of P2X7R on disease onset and/or development have
16 been observed^{18,38}, emphasizing the need for an in-depth investigation on how the ATP/P2X7R
17 signalling pathway are regulated in immune cells under normal and pathological situations.
18 Thus, we have recently reported that the regulation of T-cell sensitivity to ATP is far more
19 complex than previously considered. We have shown that P2X7R expression and ATP-induced
20 cellular functions in normal CD4⁺ and CD8⁺ T cells depend on their stages of activation and
21 differentiation³² (Mellouk et al manuscript submitted). In conventional CD4⁺ T cells, we
22 shown that recently activated (CD69⁺) naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi} T cells express a significantly
23 reduced ability to cleave CD62L compared to resting (CD69⁻) naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi} T cells
24 although they express higher levels of P2X7R. The reverse situation was observed for ATP-
25 induced pore formation and, to a lesser extent, PS externalization, which were significantly

26 upregulated in recently activated naïve compared to naïve T cells³². In Tregs, we found high
27 levels of both P2X7R membrane expression and ATP-mediated cellular responses³². In normal
28 CD8⁺ T cells, we found that while ATP treatment can trigger channel opening, pore formation,
29 CD62L shedding, PS exposure and cell death at the naïve CD44^{lo}CD45RB^{hi} stage, it was unable
30 to induce these cellular activities at the effector/memory CD44^{hi}CD45RB^{hi} stage. Importantly,
31 both CD44^{lo}CD45RB^{hi} naïve and CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory subsets express similar
32 low levels of P2X7R, demonstrating that the sensitivity of CD8⁺ T cells to ATP depends on the
33 stage of differentiation instead of P2X7R expression levels (Mellouk et al, manuscript
34 submitted). In pathogenic CD4⁻CD8⁻ T cells that accumulate in MRL/*lpr* and B6/*lpr* mice, we
35 have previously reported a marked loss of P2X7R membrane expression and consequently
36 eATP sensitivity³³, suggesting that P2X7R deficiency could dramatically amplify the severity
37 of lymphadenopathy and splenomegaly in Fas-deficient mouse strain. To gain insight in the
38 role of P2X7R in T-cell homeostasis and autoimmunity, we have generated the B6/*lpr*-P2X7KO
39 mouse strain by crossing single-mutant *lpr* and P2X7KO mice in a B6 genetic background.
40 This genetic background has been chosen because B6/*lpr* mice develop only a mild
41 lymphoproliferation and a limited lupus compared to MRL/*lpr* mice, rendering easier to detect
42 potential phenotypic changes. Importantly, B6/*lpr*-P2X7KO mice develop a massive
43 hyperplasia of secondary lymphoid organs and liver compared to B6/*lpr* mice, which peaks
44 around 7 to 8-months of age. Like in MRL/*lpr* mice, lymphadenopathy and splenomegaly in
45 B6/*lpr*-P2X7KO mice were due to the massive accumulation of B220⁺ DN T cells. B220⁺ DN
46 T cells express the FasL^{hi}CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory phenotype and high levels of
47 Eomes transcription factor. Our results are in agreement with previous studies showing that
48 Eomes deficiency in B6/*lpr* mice reduces B220⁺ DN T cell numbers³⁹. In the present study,
49 we also show that B220⁺ DN T cells mostly originate from CD8⁺ T cells at the
50 CD44^{hi}CD45RB^{hi} effector/memory stage, which display a very low sensitivity to both P2X7R

51 (Mellouk et al, manuscript submitted) and Fas receptor⁴⁰. Altogether, these data suggest that
52 P2X7R, in synergy with Fas death receptor, is physiologically involved in the homeostasis of
53 CD8⁺ T cells especially at the effector/memory stage. Finally, most CD4⁺ and CD8⁺
54 subpopulations from B6/*lpr*-P2X7KO mice expressed with ageing a late stage of activation
55 characterized by an EMRA-like (CD44^{hi}CD45RB^{hi}CD62L⁻CRR7⁻) or exhausted (Tim3⁺PD1⁺)
56 phenotype. This hyperactivation state of T-cell subpopulations rendered B6/*lpr*-P2X7KO mice
57 unable to generate high numbers of OVA-specific CD8⁺ T cells and produce high titers of anti-
58 Ad and anti-OVA IgG antibodies, which could be due to a reduce frequency of naïve precursor
59 T cells and/or the inability of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to respond to an antigenic challenge due
60 to a hyperactivation state and/or DCs to efficiently process OVA and Ad antigens. However,
61 activated CD8⁺ T cells from AdOVA-immunized B6/*lpr*-P2X7KO mice have not lost the ability
62 to differentiate into short-lived (SLEC), double-positive (DPEC) or memory-precursor (MPEC)
63 effector cells from early-effector cells (EEC) specific for OVA peptide SIINFEKL. The
64 development into these different subtypes of effector cells is considered to be dependent on
65 cytokine milieu during CD8⁺ T cell priming, in particular, the amount of IL-12⁴¹ and/or the
66 frequency of naïve CD8⁺ T cell precursor⁴²⁻⁴⁴. Therefore, our data suggest that the development
67 into SLEC or MPEC subsets in AdOVA-immunized B6/*lpr*-P2X7KO mice is most probably
68 under the control of cytokine milieu but not of naïve T cell precursor frequency.

69 To determine whether the massive dysregulation of T-cell homeostasis observed in
70 B6/*lpr*-P2X7KO mice could amplify the limited lupus-like syndrome of B6/*lpr* mice, we have
71 analyzed in B6/*lpr*-P2X7KO mice serum levels of autoantibodies and cytokines. We found
72 significant higher levels of anti-DNA auto-antibodies and RF in sera from B6/*lpr*-P2X7KO
73 mice than B6/*lpr* mice. Importantly cytokine profiles in sera from B6/*lpr*-P2X7KO seem to be
74 more complex than those found in MRL/*lpr* profile. For instance, while inflammatory (IL-12)
75 and Th1 (IFN- γ) cytokines were expressed at similar high levels in sera from both mouse

76 strains, Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) cytokines were measured at significant higher levels in sera
77 from B6/*lpr*-P2X7KO mice than MRL/*lpr* mice.

78 Anti-DNA autoantibodies and RF play an important pathogenic role in SLE through
79 immune complex-mediated damage in kidneys and other organs. Likewise, inflammatory
80 cytokines are major mediators of several autoimmune and inflammatory diseases. Although
81 B6/*lpr*-P2X7KO mice contain high serum levels of inflammatory cytokines, anti-DNA
82 autoantibodies and RF they did not develop the severe skin lesions that characterize the
83 MRL/*lpr* model. Besides C-reactive protein levels remained low in sera of B6/*lpr*-P2X7KO
84 mice compared to MRL/*lpr* mice. However, the livers of B6/*lpr*-P2X7KO mice, but not
85 MRL/*lpr* mice showed massive T-cell infiltrates, especially B220⁺ DN T cells, suggesting that
86 target organs/tissues differ between the two models of SLE. Therefore, next to invaluable
87 models of SLE such as that of MRL/*lpr* mice, the B6/*lpr*-P2X7KO mouse strain is a novel
88 model of T-cell homeostasis dysregulation and lupus development, which could allow the
89 discovery of novel mechanisms responsible of the onset or the severity of systemic auto-
90 immune disease.

91

1 **Figure legends**

2 **Figure 1. B6/*lpr*-P2X7RKO mice develop a massive hyperplasia of secondary lymphoid**
 3 **organs with aging due to the accumulation of T lymphocytes.** Panels **A** and **B** show
 4 representative photographs of the spleen and lymph nodes (cervical, axillary and distal) from 4
 5 month-old MRL/*lpr* mice and 7 to 8 month-old B6 (WT), B6/*lpr*, B6-P2X7KO and B6/*lpr*-
 6 P2X7KO female mice. Histogram shows mean (\pm SEM) absolute numbers of splenic
 7 leukocytes in each mouse strains ($n \geq 6$ mice per strain). The massive hyperplasia of lymph
 8 nodes is noticeable on whole body picture of living B6/*lpr*-P2X7KO mice (**A**, bottom panel,
 9 red asterisk). (**C**) Spleen cells of each mouse strain (4 and 8 month-old female mice) were
 10 stained with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220 or isotype
 11 controls. CD90⁺ T cells and CD90⁻B220⁺ B cells numbers were quantified by flow cytometry,
 12 and data are expressed as mean (\pm SEM; $n \geq 6$ mice per strain) percentages (stacked bar graph)
 13 and absolute numbers (histograms). Asterisks denote statistically significant differences
 14 between the indicated groups (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

15
 16 **Figure 2. Accumulation of CD4⁻CD8⁻ (DN) T lymphocytes in the spleen of B6/*lpr*-**
 17 **P2X7RKO mice.** Spleen cells from 4 month-old MRL/*lpr* and 7 to 8 month-old B6, B6/*lpr*,
 18 B6-P2X7KO and B6/*lpr*-P2X7KO female mice were stained with either fluorescent mAbs
 19 against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8 or isotype controls. (**A**) CD4 versus CD8
 20 expression was assessed on gated CD90⁺ T cells by flow cytometry. At least 20 000 events
 21 were analyzed from each sample. Cell debris, dead cells and doublets were gated out. Dot
 22 plots are representative of at least six independent mice per strain. The results are also depicted
 23 as mean (\pm SEM; $n \geq 6$ mice per strain) percentages and absolute cell numbers of CD4⁺ (**B**, ■),
 24 CD8⁺ (**C**, ■) and CD4⁻CD8⁻ (DN) (**D**, □) CD90⁺ T cells. (**E**) Stacked bar graph show relative
 25 percentages and absolute numbers of CD4⁺, CD8⁺ and DN among splenic CD90⁺ T cells.

26 Asterisks denote statistically significant differences between the indicated groups (* $p \leq 0.05$,
 27 ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

28

29 **Figure 3. B220⁺ DN T lymphocytes become predominant in the spleen and LNs of B6/*lpr*-**
 30 **P2X7KO mice with aging.** Spleen and LN cells from 4 month-old MRL/*lpr* and 7 to 8 month-
 31 old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO and B6/*lpr*-P2X7KO female mice were stained with either
 32 fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8 or isotype controls. (A)
 33 B220 marker expression on splenic CD90⁺ T cells was evaluated in each mouse strain by flow
 34 cytometry. (B) CD4 versus CD8 expression was analyzed on gated B220⁻ and B220⁺ CD90⁺
 35 T cell subsets from MRL/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice by flow cytometry. Cell debris, dead
 36 cells and doublets were gated out. Histograms and dot plots are representative of at least six
 37 independent mice per group. At least 20 000 events were analyzed from each sample. (C) The
 38 mean (\pm SEM) percentages and absolute cell numbers of splenic B220⁺ CD4⁻CD8⁻ (DN) T cells
 39 were quantified in at least 6 mice per strain by flow cytometry. (D) The kinetic of B220⁺ DN
 40 T cells accumulation in LNs of (■) B6/*lpr*, (Δ) B6/*lpr*-P2X7KO and (\circ) MRL/*lpr* mice was
 41 measured from newborn to 32 weeks-old mice by flow cytometry. At least 6 mice were used
 42 per age and results are expressed as mean \pm SEM. Asterisks denote statistically significant
 43 differences between the indicated groups (*** $p \leq 0.001$).

44

45 **Figure 4. Massive infiltration of T cells into the liver of B6/*lpr*-P2X7KO mice**

46 (A) Histological examination of mononuclear cell infiltrates (arrows) in liver and kidney
 47 (original magnification, 50 \times) sections from 8-month-old B6/*lpr*-P2X7KO mouse. (B)
 48 Infiltrating leukocytes isolated of individual liver from 4 month-old MRL/*lpr* and 7 to 8 month-
 49 old B6/*lpr*, B6-P2X7KO and B6/*lpr*-P2X7KO female mice were stained with either fluorescent
 50 mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8 or isotype controls. The mean (\pm

51 SEM) percentages of liver CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ DN CD90⁺ T cells (IHL) were quantified in
 52 at least 6 mice per strain by flow cytometry. (C) C-reactive protein levels and alarmin IL-33 in
 53 sera from B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO, MRL, MRL/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice were quantified
 54 by ELISA (n ≥ 6 mice per strain). Asterisks denote statistically significant differences between
 55 the indicated groups (* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01).

56

57 **Figure 5. Origin of B220⁺ DN T lymphocytes that accumulate in B6/*lpr*-P2X7KO mice.**

58 Spleen cells from 4 month-old MRL/*lpr* and 7 to 8 month-old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO and
 59 B6/*lpr*-P2X7KO female mice were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic
 60 and functional markers CD90, B220, CD4, CD8, FasL Eomes, Granzyme B or isotype controls.
 61 At least 20 000 events were analyzed from each sample. Cell debris, dead cells and doublets
 62 were gated out. (A) The levels of CD8 and CD4 expression were quantified on the CD8⁺ (■)
 63 and CD4⁺ (■) CD90⁺ T-cell subpopulations from each mouse strains by flow cytometry. (B–
 64 C) Expression levels of transcription factor Eomes (B) and Granzyme B (C) were quantified in
 65 CD8⁺ (■), CD4⁺ (■) and DN B220⁺ (□) CD90⁺ T-cell subpopulations from each mouse strain
 66 by flow cytometry, and data are expressed as mean (± SEM) percentage and MFI values (n ≥ 6
 67 mice per strain). (D) Membrane-anchored FasL was measured on CD90⁺ T cells by flow
 68 cytometry. Data are expressed as mean (± SEM) fold increase in FasL MFI on CD90⁺ T cells
 69 (relative to isotype control MFI) from each mouse strain (n = 5 to 7 mice per strain). (E) Soluble
 70 FasL levels were quantified by ELISA in the sera of 7 to 8 month-old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO,
 71 B6/*lpr*-P2X7KO and 4 month-old MRL/*lpr* mice female. Each symbol represents data from an
 72 individual animal and horizontal lines indicate the mean (n= 5 to 7 mice per strain). Asterisks
 73 denote statistically significant differences between the indicated groups (* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01,
 74 *** p ≤ 0.001).

75

76 **Figure 6. Pathogenic B220⁺ DN T cells in B6/*lpr*-P2X7KO express CD44^{hi}CD45RB^{hi}**
 77 **Effector/Memory phenotype but not PD1⁺TIM3⁺ exhausted phenotype.** Spleen cells from
 78 7 to 8 month-old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO, B6/*lpr*-P2X7KO and MRL/*lpr* female mice were
 79 stained with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8
 80 CD44, CD45RB, PD1, TIM3 or isotype controls. (A–B) CD44 versus CD45RB dot plots
 81 allowed to determine percentages of naïve (CD44^{lo}CD45RB^{hi}) and Effector/Memory (either
 82 CD44^{hi}CD45RB^{lo} or CD44^{hi}CD45RB^{hi}) in whole CD90⁺ T-cell population (A) and in B220⁻
 83 SP or B220⁺ DN CD90⁺ T-cell subsets (B). Cell debris, dead cells and doublets were gated out.
 84 At least 20 000 events were analyzed from each sample. Flow cytometry dot plots are
 85 representative of at least six independent mice per strain. Stacked bar graphs show (A) relative
 86 percentages of the naïve (CD44^{lo}CD45RB^{hi}) and Effector/Memory (either CD44^{hi}CD45RB^{lo} or
 87 CD44^{hi}CD45RB^{hi}) subsets among splenic CD90⁺ T cells and (B) the percentages of the
 88 CD44^{hi}CD45RB^{hi} Effector/Memory subset (□) and the B220⁺ DN subset with the
 89 CD44^{hi}CD45RB^{hi} Effector/Memory phenotype (▣) among splenic CD90⁺ T cells from the
 90 various mouse strains (n ≥ 6 mice per strain). (C) PD1 versus TIM3 expression levels were
 91 assessed in CD4⁺, CD8⁺ and DN B220⁺ T cells by flow cytometry to identify percentages of
 92 PD1⁺TIM3⁺ exhausted T cells in B6 mouse spleen (n ≥ 6 mice per strain). (D) PD1 expression
 93 in gated CD4⁺ (■), CD8⁺ (▀) or B220⁺ DN (□) T cells from B6/*lpr*-P2X7KO and MRL/*lpr* mice
 94 are shown as mean (± SEM; n ≥ 6 mice per strain) percentages. Asterisks denote statistically
 95 significant differences between the indicated groups (* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001).

96

97 **Figure 7. Autoantibodies, RF and cytokines levels in sera from B6/*lpr*-P2X7RKO mice**

98 (A) Anti-ds DNA and RF antibodies and (B) IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-12, IL-17 and IL-23
 99 cytokines were quantified by ELISA in sera from 7 to 8 month-old wild-type B6, single-mutant
 100 B6/*lpr* and B6-P2X7KO mice and double-mutant B6/*lpr*-P2X7KO mice as well as and 8 month-

101 old wild-type MRL^{+/+} and 4 month-old MRL/*lpr* female mice. Asterisks denote statistically
102 significant differences between the indicated groups (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

103

104 **Figure 8. Cellular and humoral immune responses in B6/*lpr*-P2X7KO mice immunized**
105 **with OVA-encoding adenoviral vector.** Four month-old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO, B6/*lpr*-
106 P2X7KO mice were intraperitoneally injected by 10^{10} AdOVA particles. Sera were collected
107 at 6th and 13th day after AdOVA injections. After two weeks, spleen cells from AdOVA-
108 immunized mice were stained with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90,
109 B220, CD4, CD8, KLRG1, CD127 and Tetramer/PE - H-2K^b OVA (SIINFEKL) or isotype
110 controls. Cell debris, dead cells and doublets were gated out. At least 20 000 events were
111 analyzed from each sample. (A) CD8 versus tetramers expression levels were used to quantify
112 percentages (middle panel) and absolute numbers (right panel) of OVA specific CD8⁺ T cells
113 by flow cytometry. (B) CD127 versus KLRG1 expression levels were used to quantify the
114 numbers of Tetramer⁺CD44^{hi}CD8⁺ T cells that were committed to EEC (CD127⁻KLRG1⁻),
115 SLEC (CD127⁻KLRG1⁺), MPEC (CD127⁺KLRG1⁻) and DPEC (CD127⁺KLRG1⁺) effector
116 subsets. (C) Percentages of Th1 (Tbet⁺) and Th2 (GATA3⁺) effectors CD4⁺ T-cell subsets in
117 the spleen of AdOVA-immunized mice were quantified by flow cytometry ($n \geq 6$ per mice
118 strain). (D–E) Titers of anti-Ad and anti-OVA IgG antibodies were measured by ELISA in
119 mouse sera collected on injection day (0) and 6 or 13 days after AdOVA injection. Titers of
120 complement-fixing (IgG2a and IgG2b) and non-fixing (IgG1) antibody isotypes against Ad
121 were measured at the time of sacrifice (day 15). Antibody titers ($n \geq 6$ mice per strain) were
122 expressed by log₂ optical density (OD). Asterisks denote statistically significant differences
123 between the indicated groups (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

124

125 **Supplementary Figure legends**

126 **Figure S1. Generation of B6/*lpr*-P2X7KO mice by conventional crosses between B6/*lpr***
127 **and B6-P2X7KO mice.** Fas-deficient (B6/*lpr*) and P2X7-deficient (B6-P2X7KO) B6 mice
128 were mated to produce F1 generation mice that are uniformly heterozygous for the *fas* and *P2X7*
129 mutations. F1 generation mice were subsequently mated to produce F2 generation mice. (A)
130 Wild-type and mutant alleles of the *P2X7* and *fas* genes were screened by PCR using genomic
131 DNA extracted from tails of F2 generation mice as well as forward and reverse primers for the
132 *P2X7* gene (246 pb amplicon), the *fas* gene (179 pb amplicon) and for *ETn* insertion (*lpr*
133 mutation) into the *fas* gene (217 pb amplicon). (B) Fas and P2X7R membrane expression on
134 CD90⁺ T cells from B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO and B6/*lpr*-P2X7KO mice were measured using
135 fluorescent anti-Fas mAb as well as rabbit polyclonal anti-P2X7R antiserum (1:100) and
136 fluorescent-conjugated goat anti-rabbit IgG F(ab)₂ secondary antibodies. (C) Spleen cells from
137 B6 and B6/*lpr*-P2X7KO mice were either left unstimulated or stimulated with 500 μM ATP for
138 30 min in the presence or absence of YO-PRO-1 fluorescent probe. Cells were subsequently
139 stained with fluorescent antibodies against phenotypic markers CD90, B220 and CD62L as well
140 as Annexin V fluorescent probe. CD62L shedding, pore formation, or PS exposure were
141 assessed by flow cytometry on gated CD90⁺ T cells. Results on CD62L shedding, pore
142 formation, or PS exposure are expressed as the mean percentage of CD62L⁺, YO-PRO-1⁺ or
143 Annexin V⁺ cells after stimulation (red lines) or not (black lines) with ATP. Data are
144 representative of at least six independent experiments with 7 mice per group per experiment.

145

146 **Figure S2. Accumulation of B220⁺ DN T cells in LNs and spleen of B6/*lpr*-P2X7RKO mice.**
147 Spleen and LNs cells from 7 to 8 months-old B6-P2X7RKO, B6/*lpr*, B6/*lpr*-P2X7RKO and 4-
148 month-old MRL/*lpr* mice were stained with anti-CD90, anti-CD4, anti-CD8 and anti-B220
149 mAb to assess by flow cytometry the percentages of CD4⁺ SP (■), CD8⁺ SP (■) and B220⁺ DN
150 (□) T cells. (A) B220 versus CD90 expression in spleen cells was assessed by flow cytometry.

151 At least 20 000 events were analyzed from each sample. Cell debris, dead cells and doublets
152 were gated out. Dot plots are representative of at least six independent mice per strain. **(B)**
153 Stacked bar graph show relative percentages of CD4⁺, CD8⁺ and DN among CD90⁺ T cells
154 from LNs. The results are depicted as mean (\pm SEM; $n \geq 6$ mice per strain) percentages of
155 CD4⁺ (■), CD8⁺ (■) and CD4⁻CD8⁻ (DN) (□) CD90⁺ T cells from LNs. Asterisks denote
156 statistically significant differences between the indicated groups (***) $p \leq 0.001$.

157

158 **Figure S3. Central memory and effector memory predominate in CD4⁺ and CD8⁺ T cell**
159 **subsets from B6/*lpr*-P2X7KO mice.** Spleen cells from 4 month-old MRL/*lpr* and 7 to 8
160 month-old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO and B6/*lpr*-P2X7KO female mice were stained with either
161 fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8, CD44, CD62L, CCR7
162 or isotype controls. CD44 versus CD62L expression was assessed by flow cytometry to
163 quantify percentages of CD44^{lo}CD62L⁺ naïve, CD44^{hi}CD62L⁻ effector memory (T_{EM}) and
164 CD44^{hi}CD62L⁺ central memory (T_{CM}) on gated CD4⁺ SP **(A)**, CD8⁺ SP **(B)** or B220⁺ DN **(C)**
165 CD90⁺ T cell subpopulations. Dot plots are representative of at least six independent mice per
166 group. At least 20 000 events were analyzed from each sample. Stacked bar graphs show
167 relative percentages of naïve, T_{CM} and T_{EM} CD90⁺ T cells (either SP or DN) defined by CD44
168 and CD62L expression. CCR7 expression levels were quantified on CD4⁺ SP **(A)**, CD8⁺ SP
169 **(B)** and B220⁺ DN **(C)** CD90⁺ T cells from each mouse strain by flow cytometry. Asterisks
170 denote statistically significant differences between the indicated groups (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq$
171 0.01 , ***: $p \leq 0.001$).

172

173 **Figure S4. Accumulation of Foxp3⁺ Tregs in the spleen of B6/*lpr*-P2X7KO mice.** Spleen
174 cells from 7 to 8 month-old B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO and B6/*lpr*-P2X7KO female mice were
175 stained with either fluorescent mAbs against phenotypic markers CD90, B220, CD4, CD8, and

176 Foxp3 or isotype controls. **(A)** CD4 versus Foxp3 expression was assessed by flow cytometry
177 to quantify percentages of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells. Dot plots are representative of at
178 least six independent mice per group. At least 20 000 events were analyzed from each sample.
179 **(B)** Graphs show percentages and absolute numbers of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells per
180 spleen. **(B)** IL-10 levels in sera from wild-type B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO, wild-type MRL^{+/+},
181 MRL/*lpr* and B6/*lpr*-P2X7KO mice were quantified by ELISA. Asterisks denote statistically
182 significant differences between the indicated groups (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).
183

References

- 1 Benihoud, K., Bonardelle, D., Bobé, P. & Kiger, N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol* **27**, 415-420, doi:10.1002/eji.1830270211 (1997).
- 2 Bonardelle, D., Benihoud, K., Kiger, N. & Bobé, P. B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J Leukoc Biol* **78**, 1052-1059, doi:10.1189/jlb.0904536 (2005).
- 3 Adachi, M. *et al.* Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nature genetics* **11**, 294-300, doi:10.1038/ng1195-294 (1995).
- 4 Bobé, P. *et al.* Fas-mediated liver damage in MRL hemopoietic chimeras undergoing lpr-mediated graft-versus-host disease. *Journal of immunology* **159**, 4197-4204 (1997).
- 5 Bonardelle, D. *et al.* Inflammatory arthropathy in MRL hematopoietic chimeras undergoing Fas mediated graft-versus-host syndrome. *The Journal of rheumatology* **28**, 956-961 (2001).
- 6 Bidère, N., Su, H. C. & Lenardo, M. J. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* **24**, 321-352 (2006).
- 7 Bleesing, J. J., Morrow, M. R., Uzel, G. & Fleisher, T. A. Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* **213**, 72-81 (2001).
- 8 Renno, T. *et al.* Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* **28**, 540-547 (1998).
- 9 Izui, S. *et al.* Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice. *Journal of immunology* **133**, 227-233 (1984).
- 10 Kelley, V. E. & Roths, J. B. Interaction of mutant lpr gene with background strain influences renal disease. *Clinical immunology and immunopathology* **37**, 220-229 (1985).
- 11 Benihoud, K. *et al.* Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain. *Oncogene* **21**, 5593-5600, doi:10.1038/sj.onc.1205730 (2002).
- 12 Marion, T. N. & Postlethwaite, A. E. Chance, genetics, and the heterogeneity of disease and pathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Seminars in immunopathology* **36**, 495-517, doi:10.1007/s00281-014-0440-x (2014).
- 13 Li, W., Titov, A. A. & Morel, L. An update on lupus animal models. *Current opinion in rheumatology* **29**, 434-441, doi:10.1097/BOR.0000000000000412 (2017).
- 14 Nath, S. K. *et al.* Linkage at 12q24 with systemic lupus erythematosus (SLE) is established and confirmed in Hispanic and European American families. *Am J Hum Genet* **74**, 73-82 (2004).
- 15 Elliott, J. I., McVey, J. H. & Higgins, C. F. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis research & therapy* **7**, R468-475, doi:10.1186/ar1699 (2005).
- 16 Portales-Cervantes, L. *et al.* Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Human immunology* **71**, 818-825, doi:10.1016/j.humimm.2010.05.008 (2010).
- 17 Chen, G. M. *et al.* Association of P2X7R gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Mutagenesis* **28**, 351-355, doi:10.1093/mutage/get007 (2013).

- 18 Labasi, J. M. *et al.* Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of immunology* **168**, 6436-6445 (2002).
- 19 Witting, A. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6362-6367, doi:10.1073/pnas.0510418103 (2006).
- 20 Kurashima, Y. *et al.* Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature communications* **3**, 1034, doi:10.1038/ncomms2023 (2012).
- 21 Solle, M. *et al.* Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* **276**, 125-132, doi:10.1074/jbc.M006781200 (2001).
- 22 Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232, doi:10.1038/nature04515 (2006).
- 23 Gu, B., Bendall, L. J. & Wiley, J. S. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92**, 946-951 (1998).
- 24 Le Gall, S. M. *et al.* ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Molecular biology of the cell* **20**, 1785-1794, doi:10.1091/mbc.E08-11-1135 (2009).
- 25 Loomis, W. H., Namiki, S., Ostrom, R. S., Insel, P. A. & Junger, W. G. Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **278**, 4590-4596 (2003).
- 26 Schenk, U. *et al.* Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* **1**, ra6 (2008).
- 27 Tsukimoto, M., Tokunaga, A., Harada, H. & Kojima, S. Blockade of murine T cell activation by antagonists of P2Y6 and P2X7 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 512-518, doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.011 (2009).
- 28 Yip, L. *et al.* Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *Faseb J* **23**, 1685-1693 (2009).
- 29 Atarashi, K. *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808-812, doi:10.1038/nature07240 (2008).
- 30 Schenk, U. *et al.* ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* **4**, ra12, doi:10.1126/scisignal.2001270 (2011).
- 31 Purvis, H. A., Anderson, A. E., Young, D. A., Isaacs, J. D. & Hilkens, C. M. A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *Journal of immunology* **193**, 1142-1150, doi:10.4049/jimmunol.1302467 (2014).
- 32 Safya, H. *et al.* Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage. *Frontiers in immunology* **9**, 360, doi:10.3389/fimmu.2018.00360 (2018).
- 33 Le Gall, S. M. *et al.* Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* **7**, e52161, doi:10.1371/journal.pone.0052161 (2012).
- 34 Anchim, A. *et al.* Humoral Responses Elicited by Adenovirus Displaying Epitopes Are Induced Independently of the Infection Process and Shaped by the Toll-Like

- Receptor/MyD88 Pathway. *Frontiers in immunology* **9**, 124, doi:10.3389/fimmu.2018.00124 (2018).
- 35 Bobé, P., Bonardelle, D., Benihoud, K., Opolon, P. & Chelbi-Alix, M. K. Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* **108**, 3967-3975, doi:10.1182/blood-2006-04-020610 (2006).
- 36 Morel, L. Genetics of SLE: evidence from mouse models. *Nature reviews. Rheumatology* **6**, 348-357, doi:10.1038/nrrheum.2010.63 (2010).
- 37 Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y. Y. & Morel, L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 271694, doi:10.1155/2011/271694 (2011).
- 38 Chen, L. & Brosnan, C. F. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *Journal of immunology* **176**, 3115-3126 (2006).
- 39 Kinjyo, I. *et al.* Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin. *Journal of immunology* **185**, 7151-7155, doi:10.4049/jimmunol.1003193 (2010).
- 40 Tinhofer, I. *et al.* Differential sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand⁺ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **91**, 4273-4281 (1998).
- 41 Joshi, N. S. *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**, 281-295, doi:10.1016/j.immuni.2007.07.010 (2007).
- 42 Bousso, P. *et al.* Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity* **9**, 169-178 (1998).
- 43 Casrouge, A. *et al.* Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol* **164**, 5782-5787 (2000).
- 44 Obar, J. J., Khanna, K. M. & Lefrancois, L. Endogenous naive CD8⁺ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* **28**, 859-869 (2008).

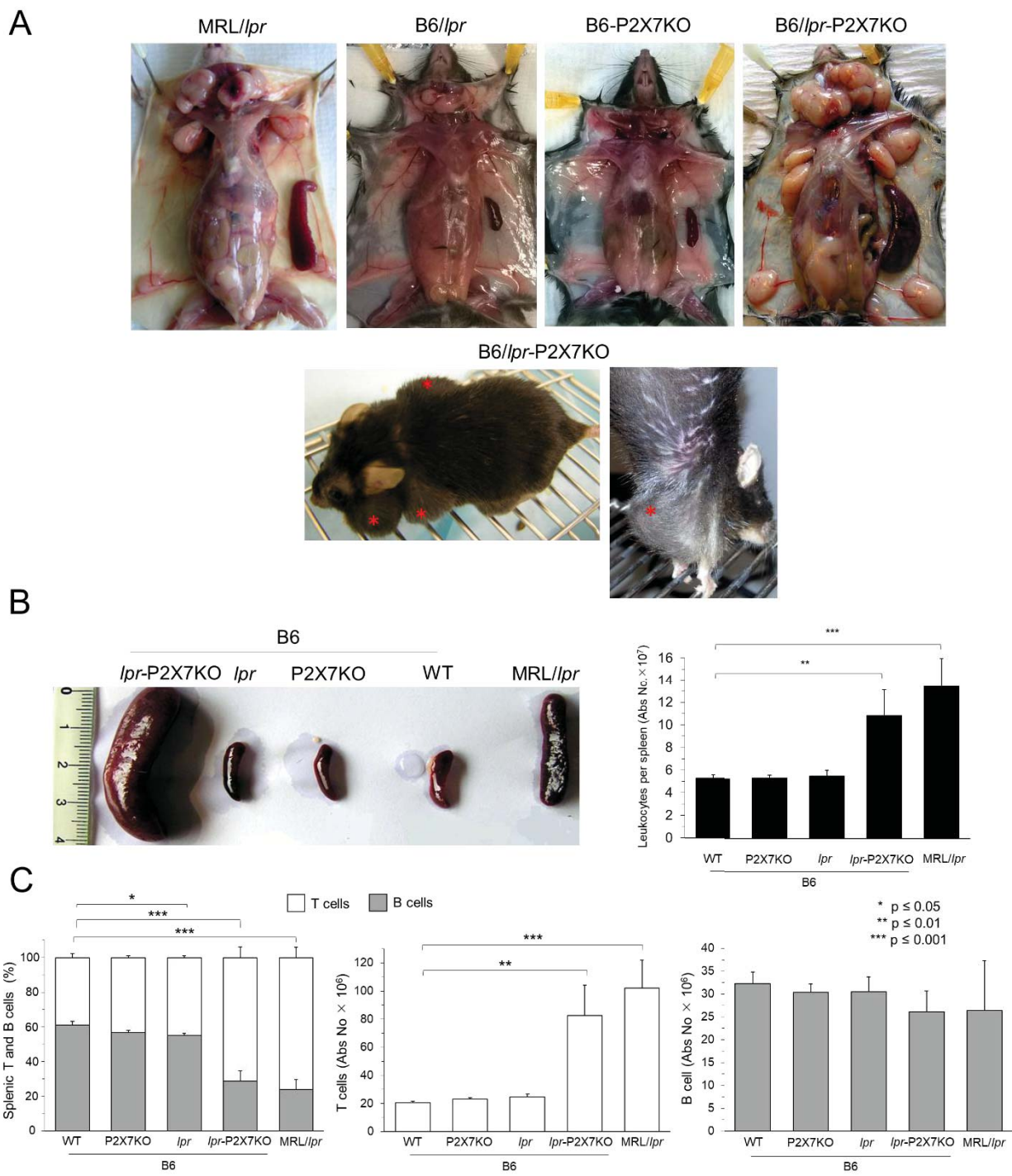
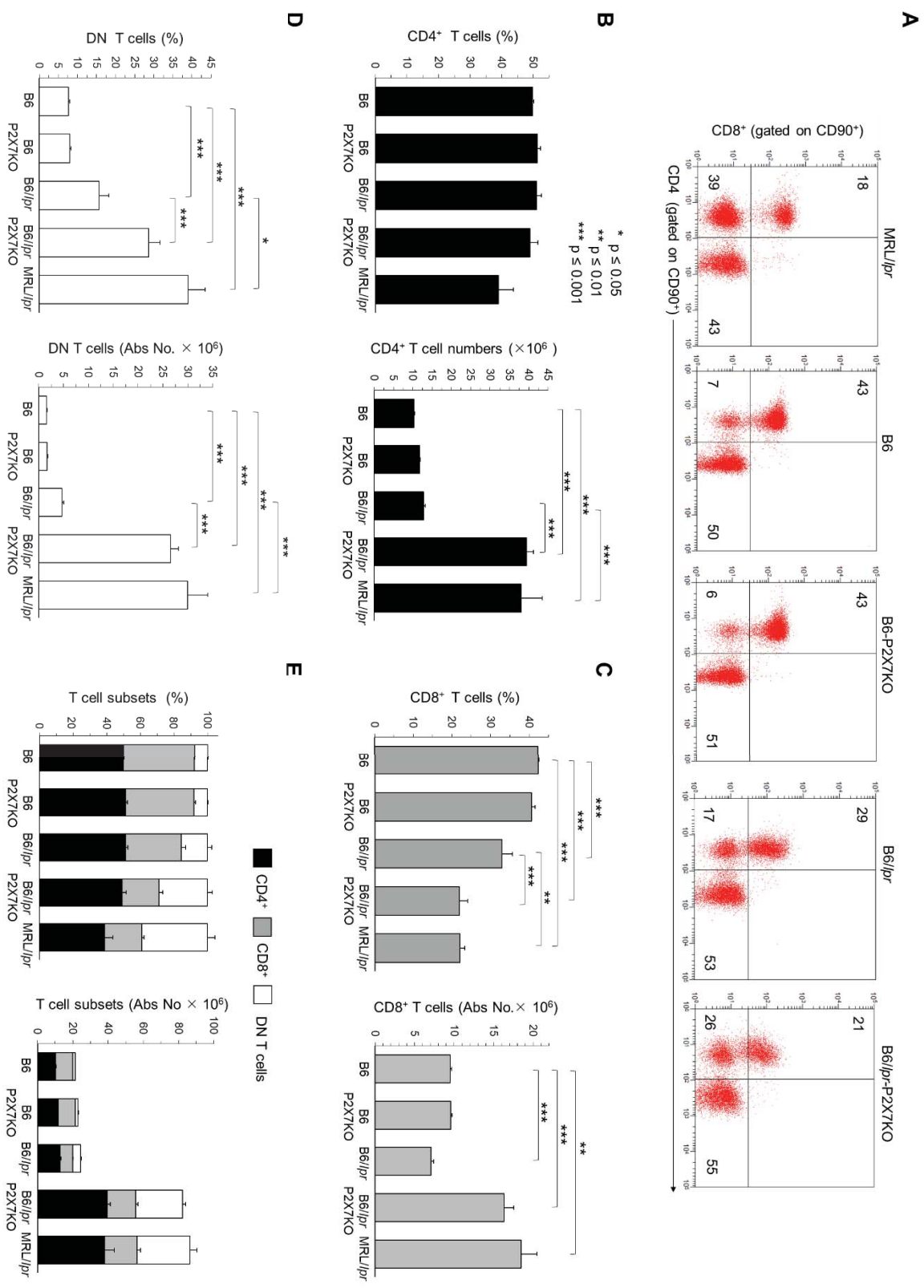


Figure 1



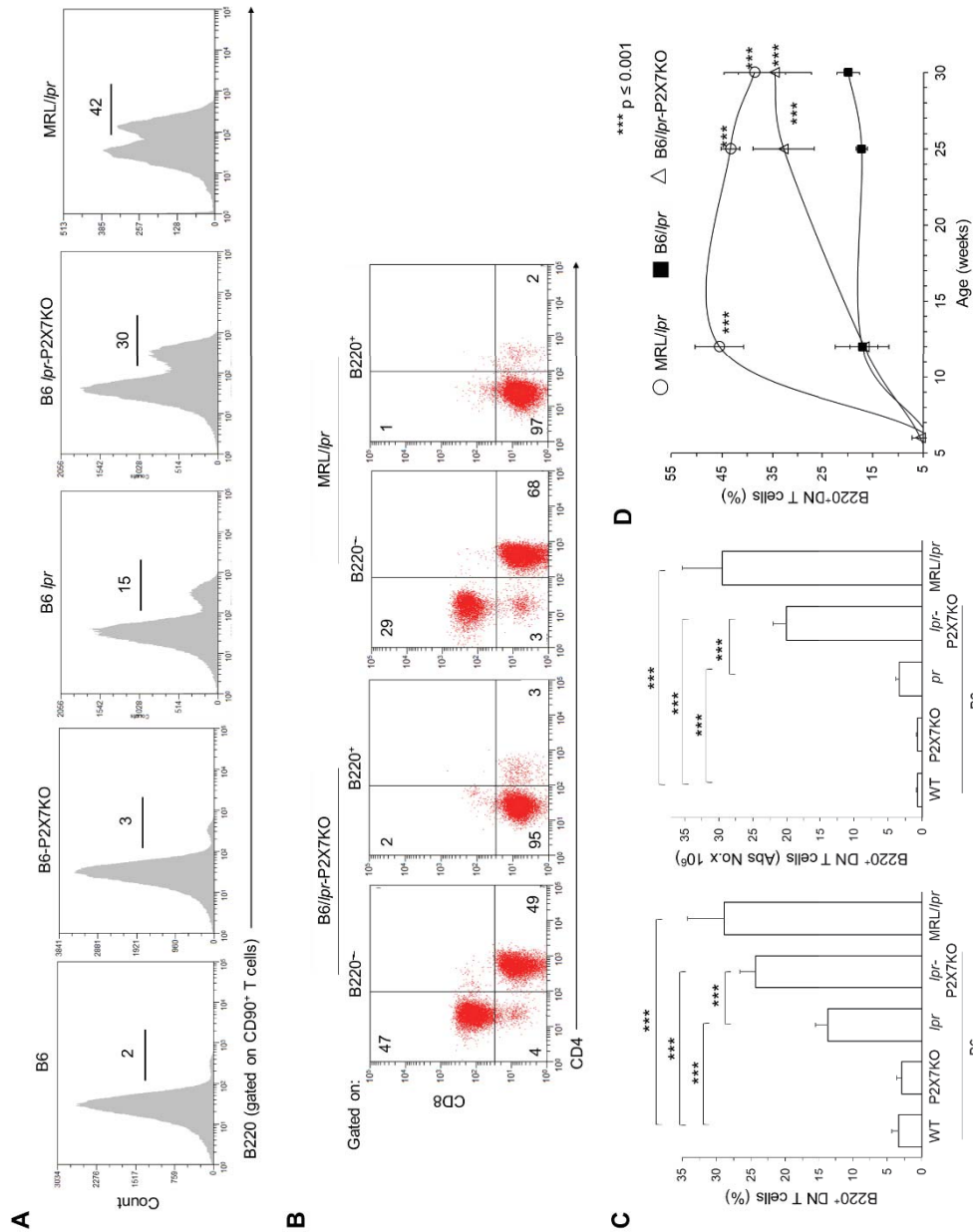


Figure 3

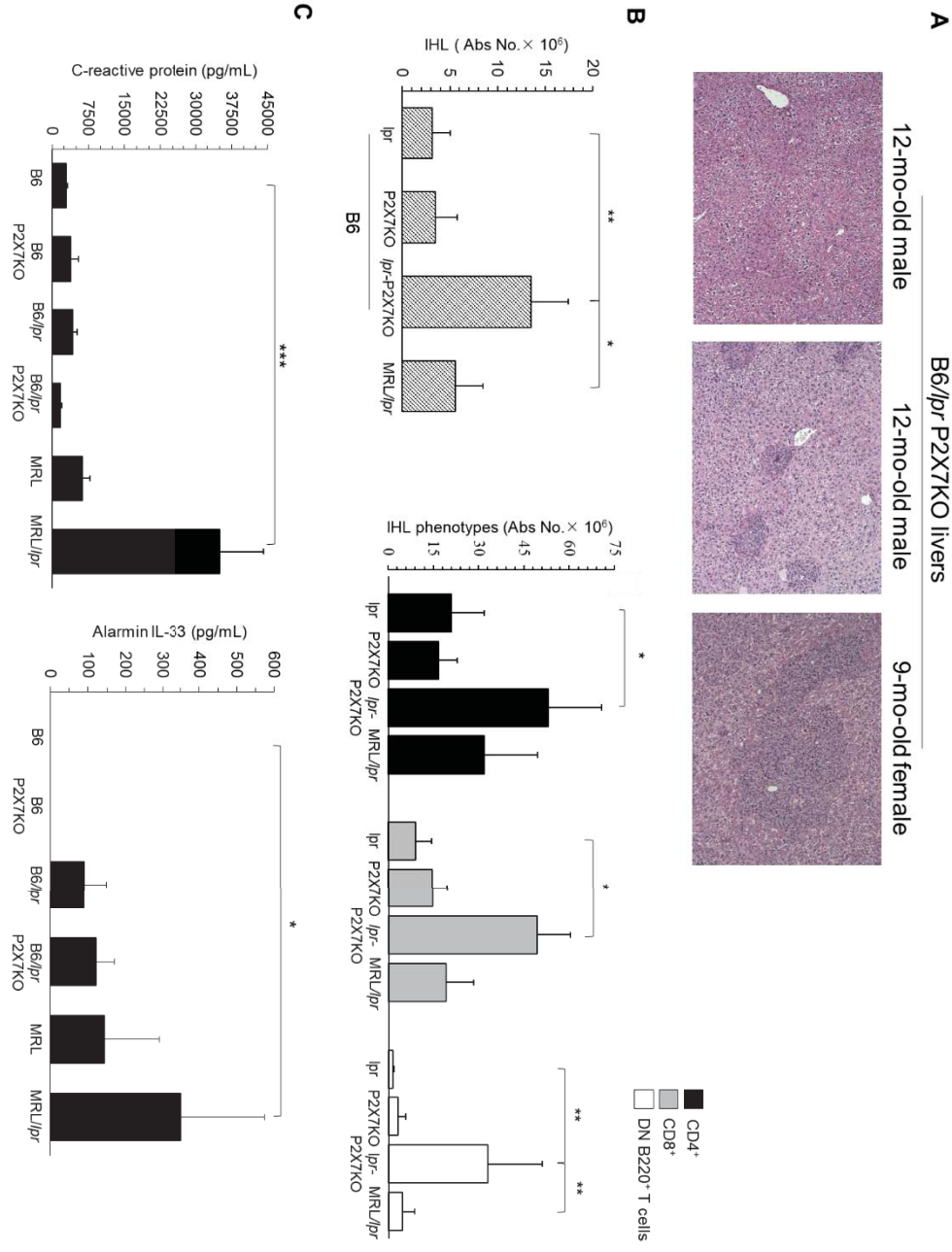


Figure 4

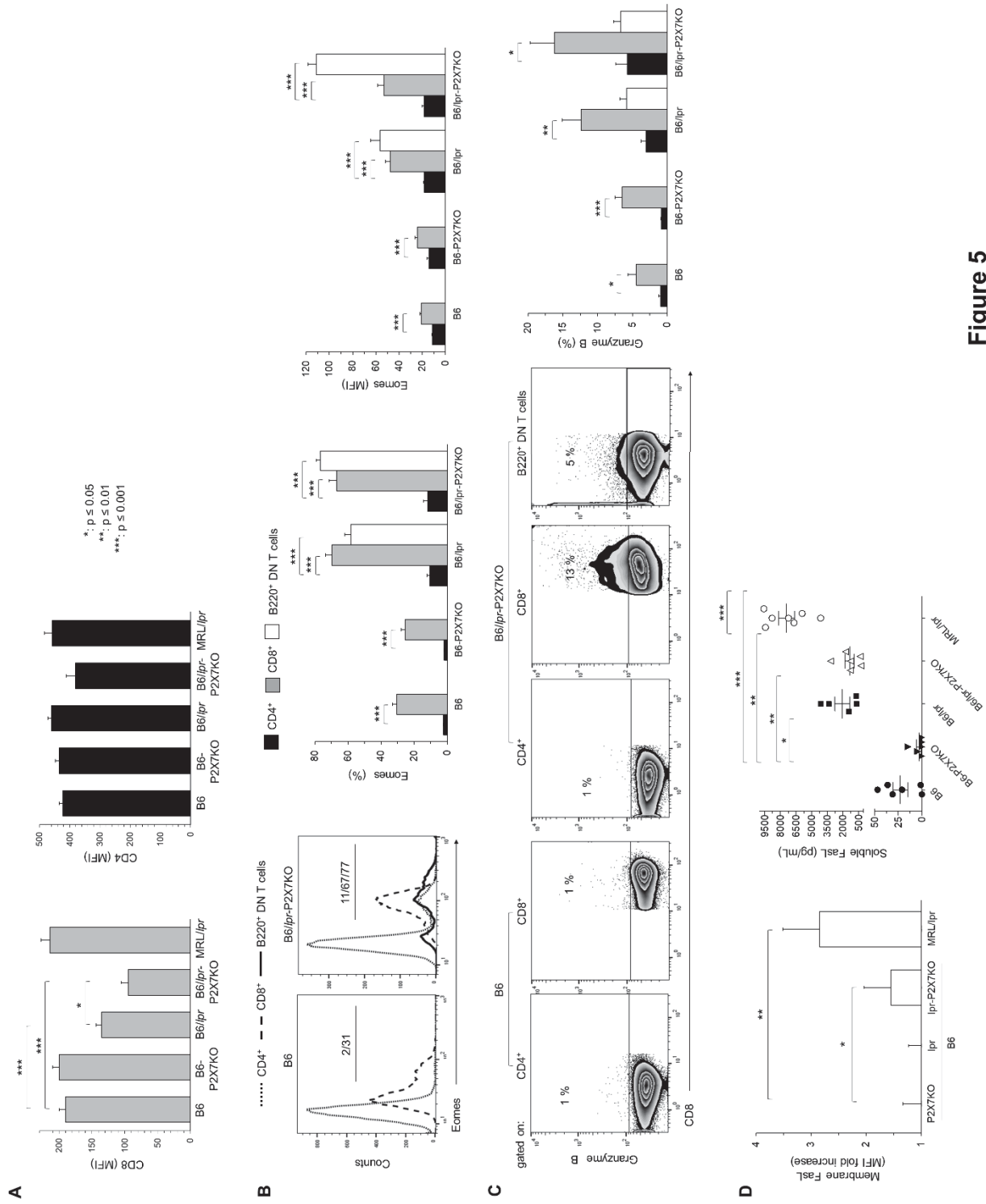


Figure 5

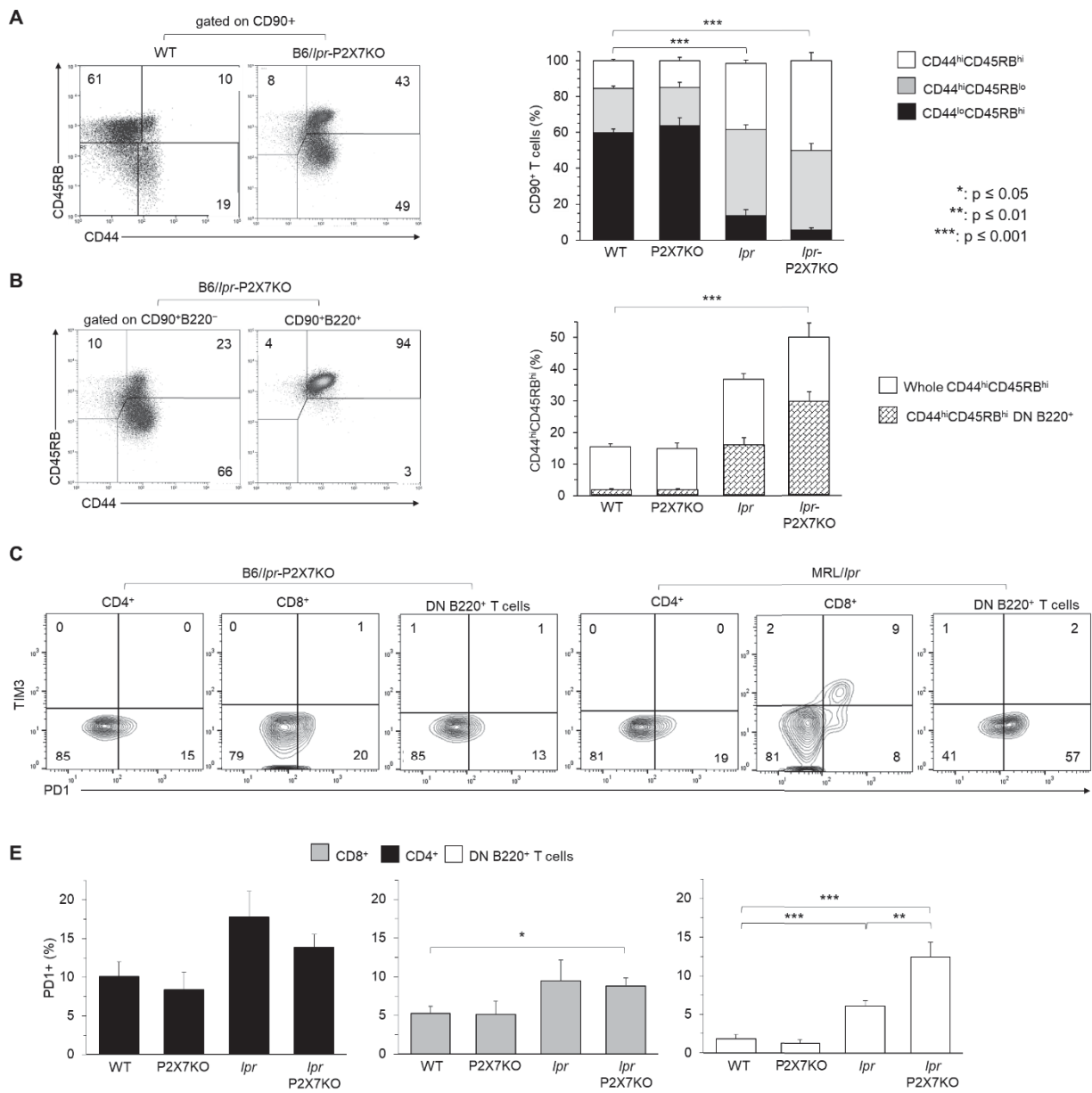


Figure 6

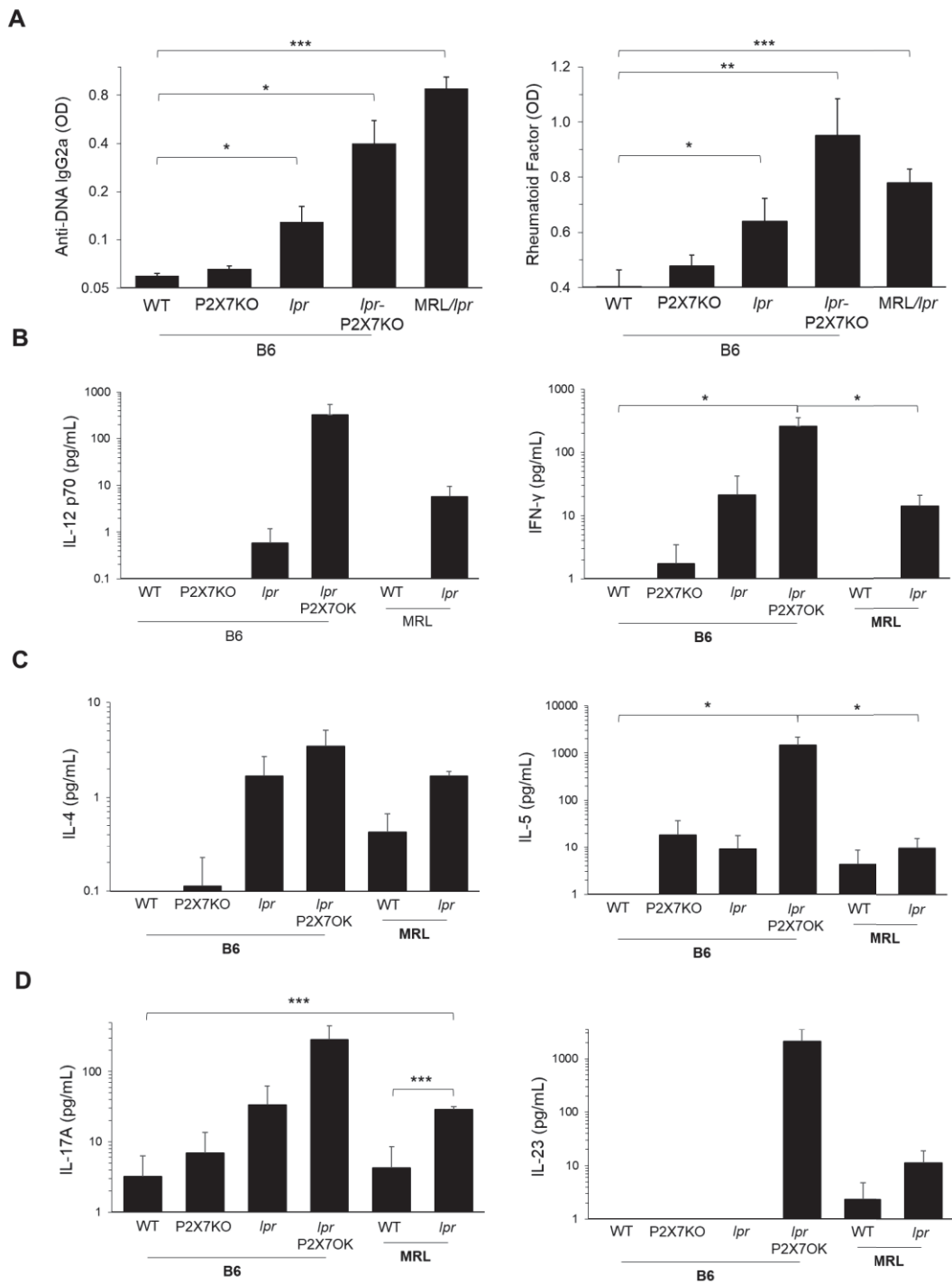


Figure 7

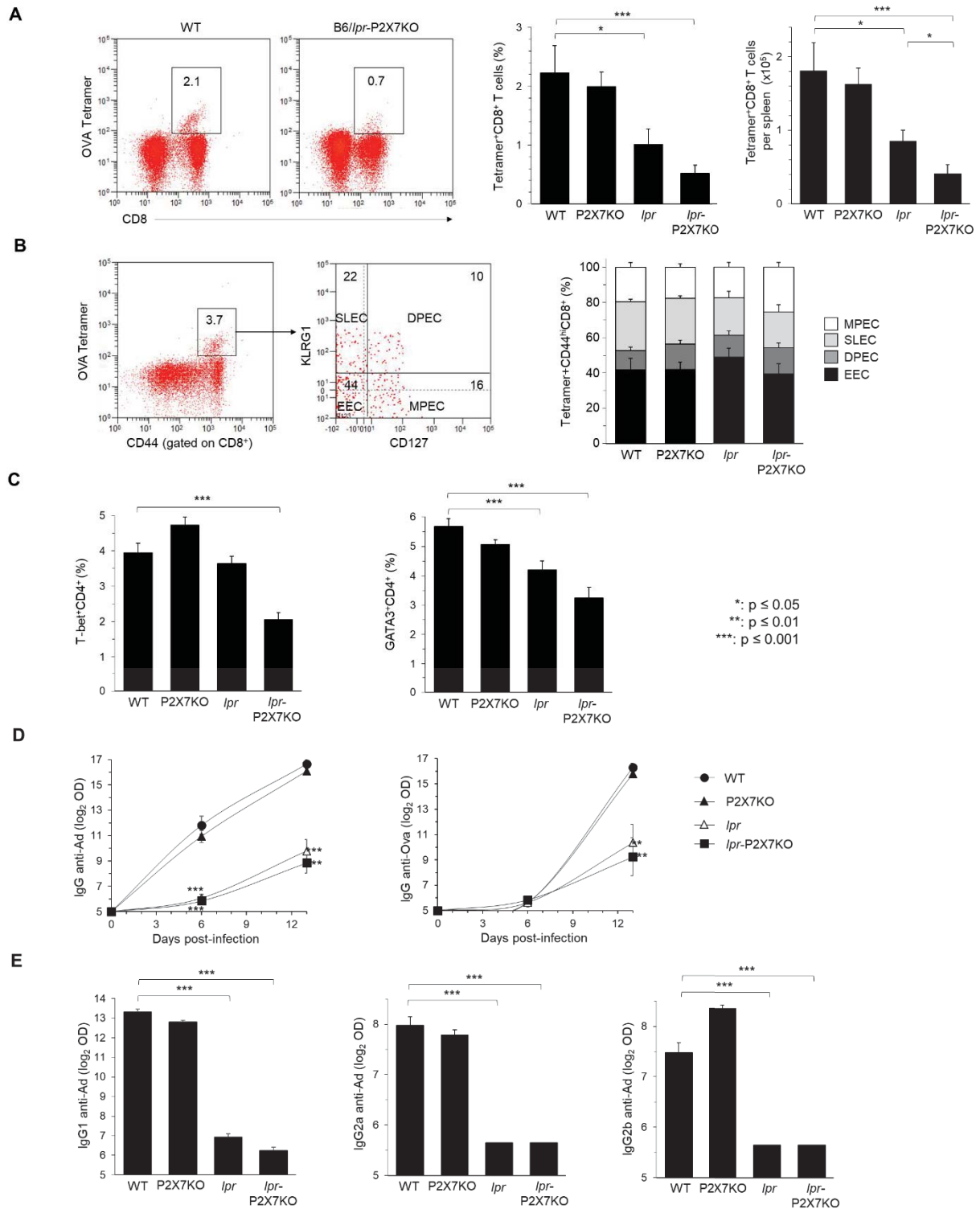


Figure 8

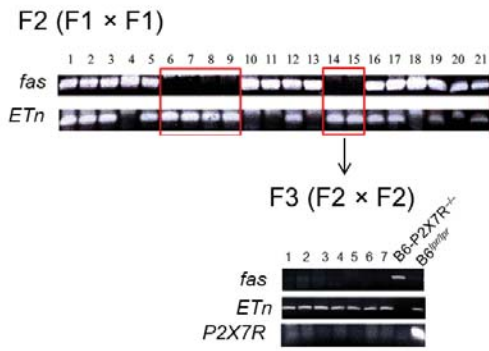
Table 1: weight of organs from MRL/*lpr*, B6/*lpr*, B6-*P2X7KO* and B6/*lpr*-*P2X7KO* mutant mice

	B6-P2X7KO (<i>n</i> =7)*	B6/<i>lpr</i> (<i>n</i> =7)*	B6/<i>lpr</i>-P2X7KO (<i>n</i> =8)*	MRL/<i>lpr</i> (<i>n</i> =6)*
Axillary LN**	0.007 ± 0.004	0.054 ± 0.072	0.338 ± 0.228	0.257 ± 0.144
Mesenteric LN**	0.064 ± 0.021	0.199 ± 0.226	0.782 ± 0.243	0.902 ± 0.368
Spleen**	0.090 ± 0.031	0.200 ± 0.085	0.787 ± 0.818	0.880 ± 0.474
Liver**	1.80 ± 0.178	1.79 ± 0.206	2.276 ± 0.587	2.637 ± 0.483

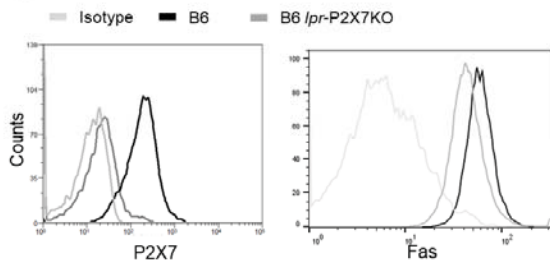
* (*n*=) mice number

** Organ weight in g. Results are expressed as mean organ weights ± SE from *n* mice. LN= lymph node

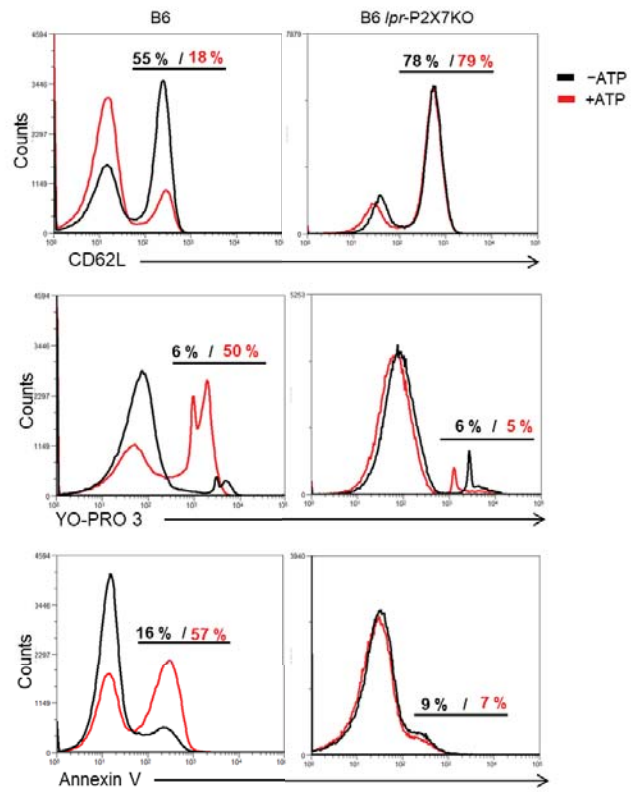
A



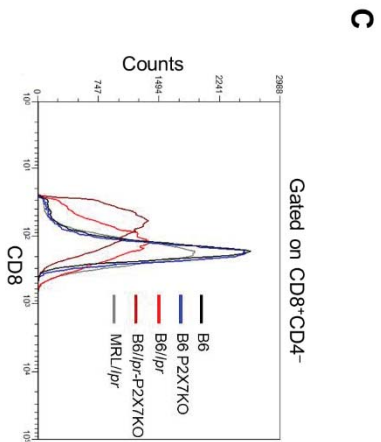
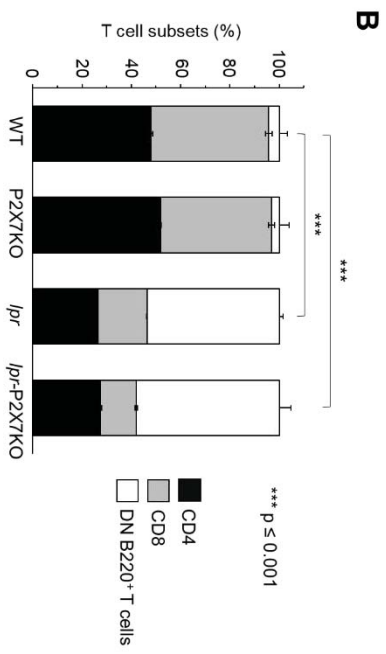
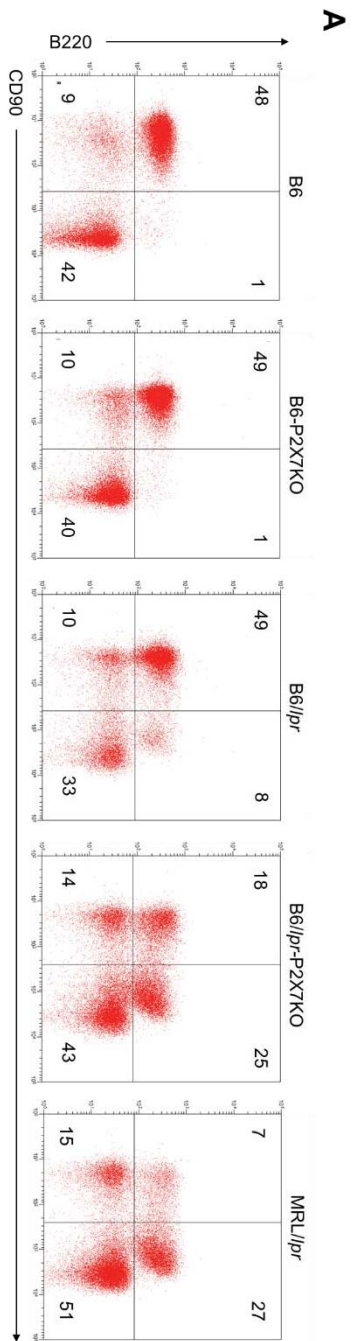
B



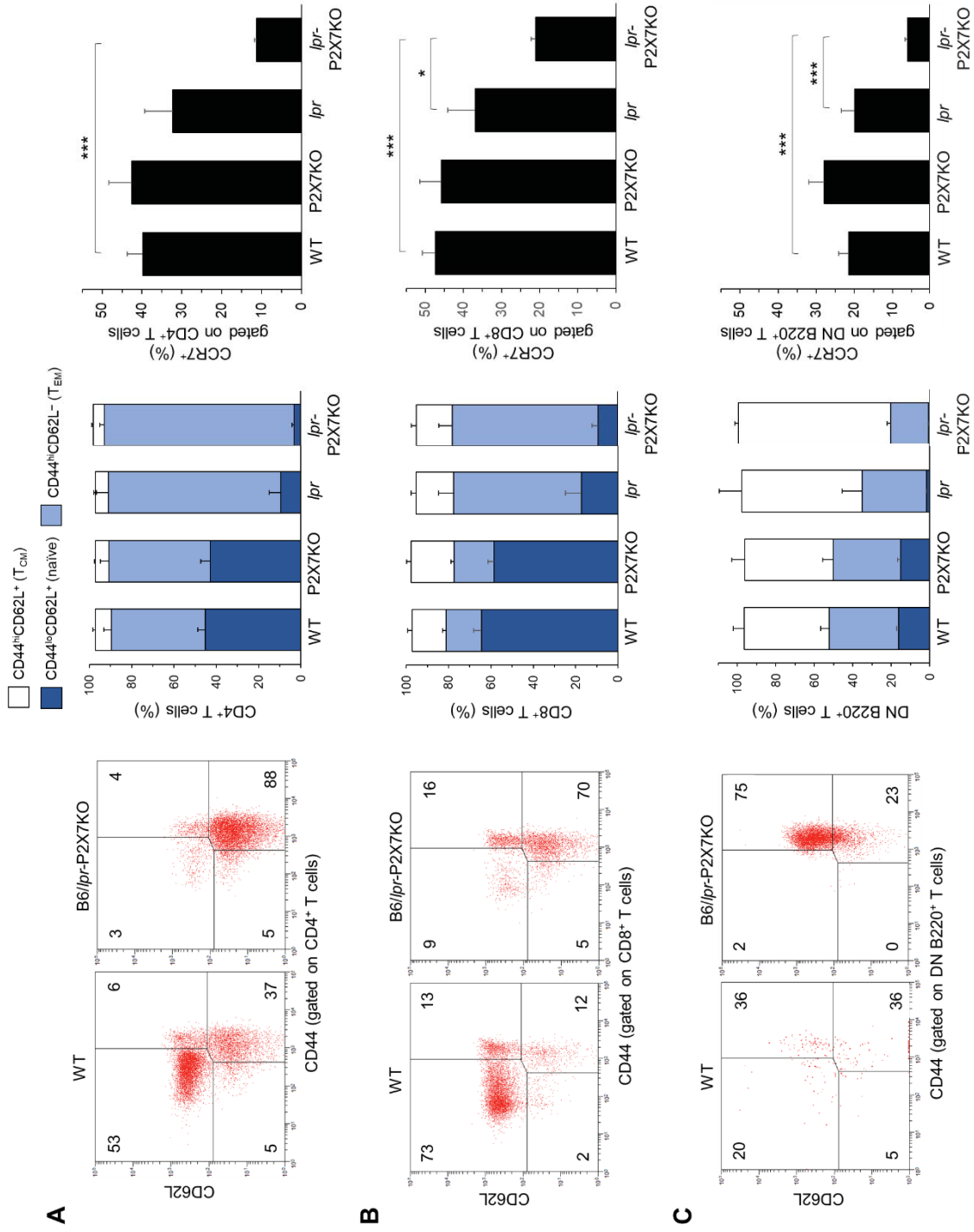
C



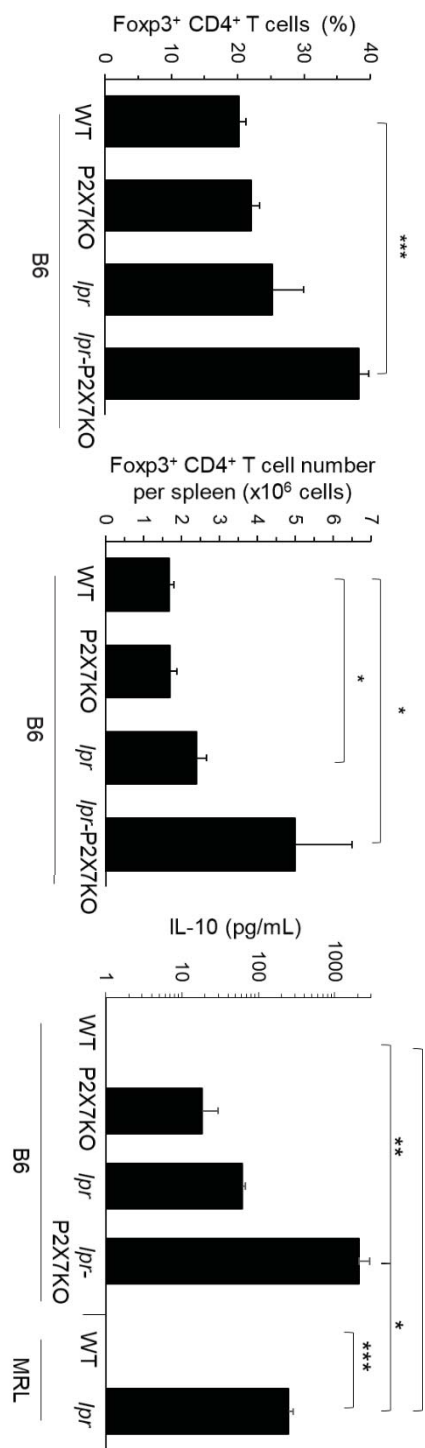
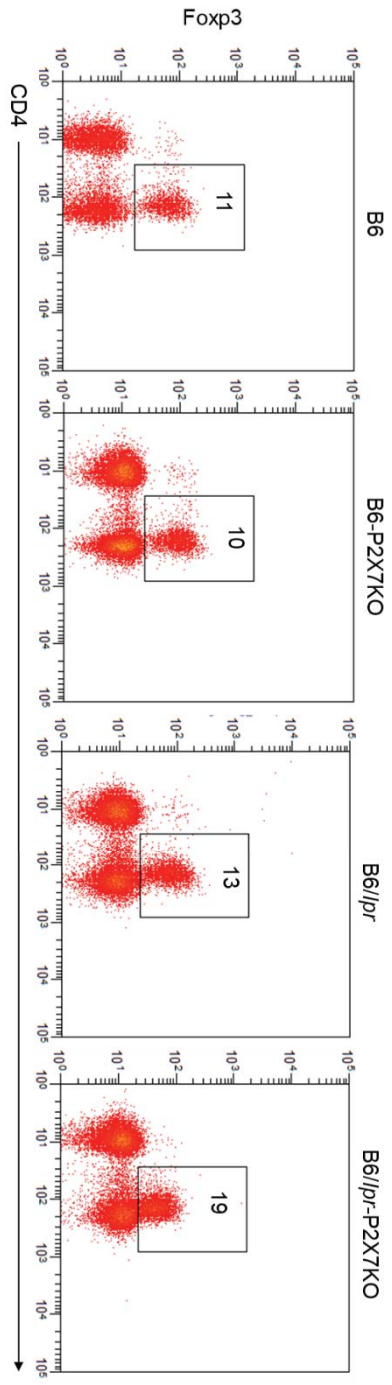
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

Résultats complémentaires

.I Matériel et méthodes

.I.1 Lignées et culture cellulaire

Les lignées cellulaires présentées ci-dessous sont cultivées en suspension dans un milieu RPMI 1640 Glutamax (Gibco, ThermoFisher Scientific) enrichi avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et d'un cocktail d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline, streptomycine et amphotéricine). Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5 % de CO₂ à une concentration variant de 200 000 à 800 000 cellules/ml selon la lignée.

EL4 : Lymphome T de souris C57BL/6N exprimant l'allèle CD90.2 et des molécules de CMH d'haplotype H-2^b. La durée de leur cycle cellulaire est d'environ 18 heures (ATCC).

L1210 : Lymphoblaste T cutané de souris DBA2. Elles expriment des molécules de CMH d'haplotype H-2K^b. Le cycle cellulaire des cellules L1210 dure environ 12 heures.

BW5147 : Thymome spontané de souris AKR/J. Elles expriment l'allèle CD90.1 et des molécules de CMH d'haplotype H-2^k. Leur cycle cellulaire dure environ 20 heures.

K-562 : Erythroleucémie myéloïde isolée de la moelle osseuse d'une patiente âgée de 53 ans.

Jurkat : Lymphome T issu du sang périphérique d'un patient âgé de 14 ans. Ces cellules secrètent de l'IL-2 et leur cycle dure environ 48 heures.

J45.01 : Lignée lymphocytaire T dérivée de la lignée jurkat. Elle a été sélectionnée sur la base de son faible taux d'expression de toutes les isoformes de la phosphatase de membrane CD45.

MOLT-4 : Lymphome T CD4⁺ déficient pour p53 isolé d'un patient âgé de 19 ans.

HPB-ALL : Leucémie aigüe lymphoblastique du sang périphérique d'un patient âgé de 14 ans.

NB4 : Leucémie aigüe promyelocytaire humaine isolée d'une patiente âgée de 23 ans.

.I.2 Analyses par cytométrie en flux des fonctions cellulaires induites par P2X7R

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C dans un milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de SVF et contenant ou pas 500 µM d'ATP. Afin de contrôler l'implication de P2X7R

dans l'induction des fonctions cellulaires, l'antagoniste spécifique A438079 (Sigma-Aldrich) est ajouté à 10 μ M avant de traiter les cellules à l'ATP. La sonde YO-PRO-1 (ou YO-PRO-3) est ajoutée au milieu de culture en même temps que l'ATP. Après l'incubation, les cellules sont lavées avec un tampon phosphate (PBS) puis marquées avec de l'annexine V fluorescente dans un volume de 100 μ l de tampon spécifique (eBioscience, ThermoFisher Scientific) pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont resuspendues dans un plus grand volume de tampon annexine V avant l'analyse par cytométrie en flux.

.I.3 Analyses par cytométrie en flux des phénotypes cellulaires

Un culot d'environ 10^6 cellules est incubé avec 75 à 125 ng de chaque anticorps spécifique dilué dans 10 μ l de tampon FACS (PBS 1 \times contenant 3% de SVF, 2% d'HEPES et 0,1% d'azide de sodium). Le marquage est réalisé pendant 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans du PBS. Le marquage avec un anticorps primaire non couplé (comme l'anti-P2X7R) ainsi que l'anticorps secondaire correspondant sont réalisés avant celui avec les anticorps couplés directement. Les marquages avec les anticorps primaires couplés directement aux fluorochromes sont effectués après l'élimination des anticorps secondaires. Les lignées cellulaires et/ou les cellules spléniques sont phénotypées par cytométrie en flux en utilisant des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochromes et dirigés contre les molécules suivantes : CD90.2/Thy1.2 (clone 30-H12), B220 (clone RA3-6B2), CD45RB (clone C363.16A), CD4 (clone GK1.5), CD8 (clone 53-6.7), CD44 (clone 20 IM7), CD62L (clone MEL-14), CD127/IL-7R α (clone A7R34) CD197/CCR7 (clone 4B12), CD39 (clone 24DMS1) et CD73 (clone 22 TY/11.8) (eBioscience). P2X7R est quantifié grâce à un sérum polyclonal de lapin anti-P2X7R de souris (développé par le laboratoire ^{7,330}) suivi d'un marquage fluorescent par des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG F(ab)' de lapin (eBioscience).

.I.4 Analyses par cytométrie en flux de la phosphorylation des MAP kinases

Après simulations par l'ATP, suivie ou non d'un marquage extracellulaire avec des anticorps fluorescents anti-phénotypiques, le culot cellulaire est repris dans 100 μ l de tampon de fixation/perméabilisation (eBioscience, ThermoFisher Scientific) et incubé pendant 10 à 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après deux lavages dans le tampon PBS, les cellules sont reprises dans du méthanol 100 % froid (-20°C) et incubées dans la glace pendant 30 minutes. Après deux lavages dans le tampon FACS (PBS 1 \times contenant 3% de SVF, 2% d'HEPES et 0,1% d'azide de sodium), les cellules

sont marquées par 100 ng d'anticorps spécifiques par million de cellules dans un volume de 10 µl de tampon FACS pendant 60 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Après lavage, les cellules sont reprises dans 0,5 à 1 mL de tampon PBS pour l'analyse au cytomètre CyFlow Partec, plateforme SplCy, Orsay ou Astrios BeckmanCoulter, plateforme CNRS ImageGIF, Gif-sur-Yvette.

.I.5 Analyses par cytométrie en flux des taux de caspases 8 activées

La quantification du taux de caspases 8 activées dans les cellules spléniques est réalisée à l'aide du Kit CHEMICON CaspaTag (Merck Millipore). Après stimulation des récepteurs Fas par l'anticorps agoniste Jo2 (BD Biosciences), les cellules spléniques sont incubées avec la sonde perméante FLICA (FAM-LEDT-FMK à 1x) pendant une heure à l'abri de la lumière, à 37°C et en présence 5 % de CO₂. Après trois lavages avec le tampon préconisé par le fournisseur, les cellules sont marquées par les anticorps fluorescents anti-phénotypiques et analysées par cytométrie en flux. La sonde FLICA est rendue fluorescente par son clivage par les caspases 8 activées.

.I.6 Analyse des flux calciques par spectrofluorométrie

Environ 10⁶ cellules sont marquées avec la sonde fluorescente Indo-1-AM à 4 µM dans 1 mL de tampon HEPES (Gibco, ThermoFisher Scientific) enrichi avec 1 mM de Ca²⁺. Après une heure d'incubation à température de la pièce sous agitation douce, les cellules sont lavées et reprises dans le tampon HBS à la concentration de 5.10⁵ cellules/mL. La stimulation des cellules par l'ATP est effectuée à 37°C pendant la lecture au spectrofluoromètre Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer (Agilent Technologies). La concentration en calcium cytoplasmique est mesurée par spectrofluorométrie à l'aide de la sonde fluorescente ratiométrique Indo-1-AM qui est excitable à une longueur d'onde de 360 nm et qui émet à deux longueurs d'onde différentes selon sa liaison ou non au Ca²⁺ : **1**) une émission à 405 nm quand la sonde est liée au Ca²⁺ et **2**) une émission à 485 nm quand la sonde est libre. La concentration du Ca²⁺ cytosolique est calculée selon l'équation $[Ca^{2+}]_{cyt} = \frac{b \times K_d (R - R_{min} R_{min})}{(R_{max} - R)}$ explicitée dans le commentaire en bas de page

¹. Le taux d'ouverture des canaux cationiques est déterminé en mesurant les flux calciques après stimulation des cellules avec 500 µM d'ATP (Sigma-Aldrich) en présence ou non de 10 µM de l'inhibiteur spécifique de

¹ **b** : ratio de la fluorescence émise à 480 nm en absence de calcium sur celle avec saturation en calcium. **K_d** : coefficient de dissociation du complexe Indo-1/Ca²⁺. **R** : Ratio des fluorescences émises à 405 et 480 nm après excitation à 360 nm. **R_{min}** : Valeur minimale de R mesurée après perméabilisation des cellules en présence d'EGTA à 5mM. **R_{max}** : Valeur maximale de R mesurée en présence d'ionomycine à 1 µM et de CaCl₂ à 10 mM.

P2X7R, A438079 (Sigma-Aldrich). L'absence d'implication du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique dans les flux calciques observés est vérifiée par le traitement des cellules avec de la thapsigargine, un inhibiteur des pompes Ca-ATPase (SERCA).

.I.7 Analyses par RT-PCR des isoformes de P2X7R exprimées dans les lignées cellulaires

Les ARN totaux des lignées EL4, L1210 et BW5147 sont extraits à l'aide kit RNeasy Minikit (Qiagen). Des culots de 10^7 cellules sont repris dans un tampon de lyse puis passées 5 à 10 fois à travers une aiguille de seringue de diamètre 20 gauge afin de casser l'ADN génomique dont la digestion est complétée par un traitement à l'ADNase I. De l'éthanol est ajouté aux échantillons afin de faciliter la fixation des ARN à la résine des colonnes RNeasy qui sont ensuite élués dans de l'eau pure dépourvue d'ARNases et d'ADNases. Leur concentration est mesurée avec un spectrophotomètre de type Nanodrop et leur qualité (présence d'ARN ribosomique 28, 18 et 5 S) est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (non présenté). Les ADNc sont synthétisés à partir des ARNm des différentes lignées en les incubant pendant 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 72°C avec des amorces oligo-dT et la Reverse transcriptase SuperScript II (ThermoFisher Scientific). Afin de cibler différentes régions du gène *p2rx7*, six couples d'amorces ont été conçus en utilisant le logiciel Primer 3 Input (<http://primer3.ut.ee/>; Tableau 5) puis synthétisées par la société MWG (Ebersberg, Allemagne). L'amplification par PCR des six fragments est effectuée en utilisant le mélange réaction ReadyMix (Sigma-Aldrich) contenant l'ADN polymérase Taq, les dNTP et le MgCl_2 . 30 cycles de PCR ont été réalisés à une température d'hybridation de 55°C et une durée d'élongation de 45 secondes. La taille correspondant à chaque fragment a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % (non présenté). 1 μg du produit de chaque PCR a été séquencé par la société MWG (Ebersberg, Allemagne) en utilisant les mêmes amorces (Tableau 5).

.I.8 Lignées de souris

Les études *in vivo* sont effectuées à l'aide des 5 lignées de souris suivantes : la lignée de référence C57BL/6J (B6) (The Jackson Laboratory), les souris B6.129P2-P2rx7^{tm1Gab}/J (B6-P2X7KO) déficientes en P2X7R produites sur le même fond génétique (The Jackson Laboratory), les souris MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J (MRL/lpr; The Jackson Laboratory) décrites dans le paragraphe .V.1 (page 62) et utilisées comme lignée de référence pour le syndrome lupique dans nos études, la lignée B6.MRL-Fas^{lpr}/J (B6/lpr) portant la même mutation *lpr* du gène Fas que le modèle initiale MRL/lpr mais avec un fond génétique C57BL/6J (The Jackson Laboratory) et

enfin la lignée B6//*lpr*-P2X7KO construite par notre laboratoire et issue du croisement de la lignée B6-P2X7KO avec la lignée B6//*lpr*. L'ensemble de ces lignées sont élevées au sein du laboratoire Transgènèse et Archivage d'Animaux Modèles (TAAM-UPS44) du CNRS (Orléans, France).

.1.9 Analyses par RNAseq et RT-QPCR du transcriptome des lignées de souris

Des rates et des ganglions mésentériques de souris B6, B6//*lpr*, B6-P2X7KO, MRL//*lpr* et B6//*lpr*-P2X7KO ont été prélevés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide. Pour chaque lignée, six souris ont été analysées individuellement. De plus, les lignées MRL//*lpr* et B6//*lpr*-P2X7KO ont été étudiées avant et après le développement de la pathologie.

.1.9.a RNAseq

Les analyses du transcriptome des 5 lignées de souris ont été effectuées dans le cadre d'un projet international de l'Agence National de la Recherche (ANR) coordonné par notre équipe en collaboration avec deux équipes Taiwanaïses dirigées par les docteurs Yao-Ting Huang et Chung-Ming Chang des universités de Chung-Cheng et Chang Gung qui étaient en charge du séquençage des ARN extraits de la rate et des ganglions lymphatiques des différentes lignées de souris.

.1.9.b QPCR

Les gènes d'intérêt mis en évidence par RNAseq ont été validés par des analyses de RT-QPCR (technique Taqman) au sein de la plateforme de PCR Quantitative de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), CNRS, Gif-sur-Yvette sous la direction du Docteur Éric Jacquet.

.1.9.c Extraction et control de la qualité des ARN

Les organes d'au moins 6 souris par lignée sont broyés à 6500 rpm dans un volume de 1 mL de Trizol à l'aide du broyeur Precellys Bertin et en présence de billes CK-Mix Bertin (Montigny-le-Bretonneux). Trois broyages de 15 secondes sont effectués pour chaque organe avec une pause de 30 secondes entre deux broyages. Les ARN sont purifiés en utilisant le kit RNeasy MiniKit (Qiagen) et leur quantification est effectuée avec un spectrophotomètre NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Les échantillons retenus ont des rapports $\frac{DO \text{ mesurée à } 260 \text{ nm (acides nucléiques)}}{DO \text{ mesurée à } 280 \text{ nm (protéines)}}$ qui avoisinent la valeur « idéale » de 2. Leur concentration moyenne en ARN est de 380 ng/μL et leur qualité est contrôlée à l'aide du kit RNA 6000 Nano Agilent (Santa Clara) et du BioAnalyser Agilent 2100. Les échantillons d'ARN retenus ont tous un nombre d'intégrité (RIN,

RNA integrity number) supérieur à 7 caractéristique d'une bonne qualité. Les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN à l'aide du kit « *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* » (Life Technologies) et des incubations successives de 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C et 5 minutes 85°C.

.I.9.d Sélection des gènes de référence

Les gènes de référence sont sélectionnés à l'aide des outils informatiques GeNorm et NormFinder de GenexPro (<http://genex.gene-quantification.info/>). Parmi les six gènes testés, trois (Hprt1, Ppia et Tbp) ont été retenus pour leur taux d'expression très proche entre les différents échantillons. Toutes les données de RT-PCR quantitative ont été normalisées par les taux d'expression de ces trois gènes.

.I.9.e Calculs des quantités relatives

Le Ct (*Cycle Threshold*) a été limité pour chaque gène à 38 cycles (limite de détection) fiabilité des résultats. Les variations d'expression en ARNm de chaque échantillon (quantités relatives, RQ) ont été estimées après normalisation de leurs valeurs par la moyenne géométrique de celles des trois gènes de référence Hprt1, Ppia et Tbp. Les valeurs utilisées en référence pour le calcul des rapports sont déterminées par la moyenne arithmétique des Ct des duplicats biologiques. Des tableaux de résultats des calculs de variation d'expression sont réalisés sur chaque échantillon individuellement en utilisant les valeurs de référence. Les *heatmap* sont réalisées à l'aide du logiciel GENE-E Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

.I.10 Construction de lignées de souris déficientes pour P2X7R de façon conditionnelle

Afin d'obtenir une élimination de P2X7R uniquement dans les lymphocytes T, des cellules ES, transfectées avec la construction de la Figure 31 (consortium européen EUCOMM), ont été injectées dans des blastocytes de souris B6 par le SEAT (CNRS/Villejuif). Les animaux obtenus ont ensuite été croisés avec des souris transgéniques pour la recombinase Flip sous le contrôle du promoteur du gène d'expression ubiquitaire *actb* (codant pour la protéine β-actine) (souris « *deleter* »)⁴²⁰. Ce croisement a permis d'éliminer le fragment d'ADN situé entre les sites FRT (cassettes β-gal et néo, Figure 31).

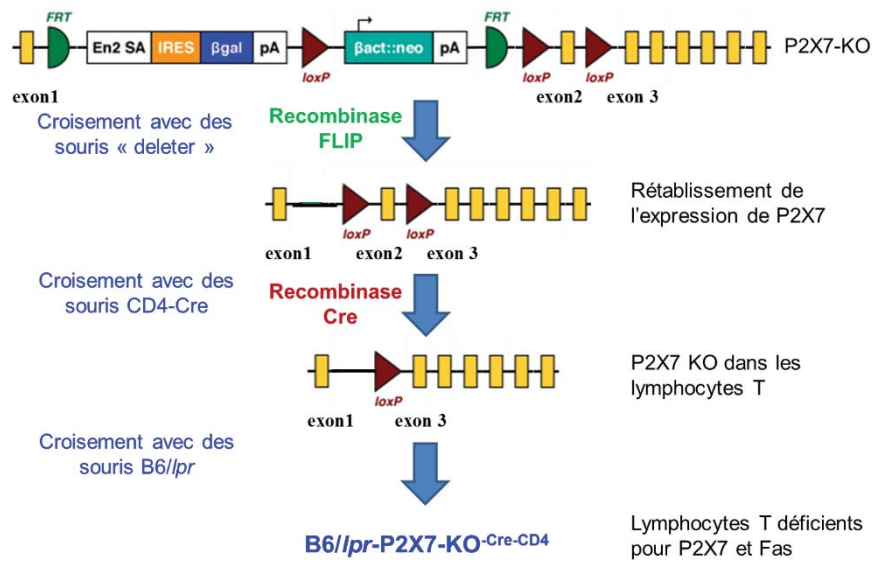


Figure 31 : Transgène utilisé pour produire des lignées de souris invalidées de façon conditionnelle pour P2X7R

La figure présente un exemple de croisements entre les souris CD4-Cre et les souris floxées afin d'obtenir des souris conditionnellement déficientes pour P2X7R dans les lymphocytes T. Ces souris sont ensuite croisées avec des souris B6/lpr pour produire la lignée de souris B6/lpr-P2X7KO^{CD4-Cre}.

Les souris contenant l'exon 2 de *p2rx7* « floxé » ont été croisées avec une souris transgénique pour la recombinaison Cre. Pour retirer spécifiquement P2X7R des lymphocytes Treg le croisement est réalisé avec une souris transgénique dont la recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur du gène *Foxp3* (*Foxp3-Cre*). D'autre part, ces souris expriment le facteur de transcription *Foxp3* fusionné à la protéine fluorescente EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) afin de faciliter l'analyse des lymphocytes Treg *Foxp3*⁺ par cytométrie en flux. L'expression d'EYFP n'affecte pas les fonctions du facteur de transcription *Foxp3*. Ces souris B6-P2X7KO^{Cre-FoxP3} sont en cours de croisement avec les souris B6/lpr afin d'évaluer l'implication du P2X7R des lymphocytes Treg dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement des maladies auto-immunes. De plus, nous croisons actuellement des souris ayant l'exon 2 de *p2rx7* « floxé » avec des souris CD4-Cre, ThPOK-Cre et Eomes-Cre afin d'éliminer le récepteur P2X7, respectivement, dans les lymphocytes T totaux, les lymphocytes Th et les CTL. Les souris obtenues seront croisées avec des souris B6/lpr pour produire les lignées de souris B6/lpr-P2X7KO^{CD4-Cre}, B6/lpr-P2X7KO^{ThPOK-Cre} ou B6/lpr-P2X7KO^{Eomes-Cre}.

.II Résultats

.II.1 Les lymphocytes T CD8⁺ sont plus résistants que les lymphocytes T CD4⁺ à la voie Fas/FasL au stade effecteur/mémoire

Des études précédentes ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ sont moins sensibles à la mort cellulaire induite par la voie Fas/FasL que les lymphocytes T CD4⁺ ⁴²¹. Nous montrons que cette différence de sensibilité est liée à la présence majoritaire d'une sous-population de lymphocytes T effecteurs/mémoires CD8⁺ de phénotype CD44^{high}CD45RB^{high}. En effet, après deux heures de stimulation du récepteur Fas par l'anticorps agoniste Jo2 ⁴²², ils présentent des pourcentages moins élevés de cellules apoptotiques (Figure 32). Comme attendu, les lymphocytes T naïfs étaient moins sensibles à l'apoptose induite par la voie Fas/FasL que les lymphocytes T effecteurs/mémoires (résultats non présentés).

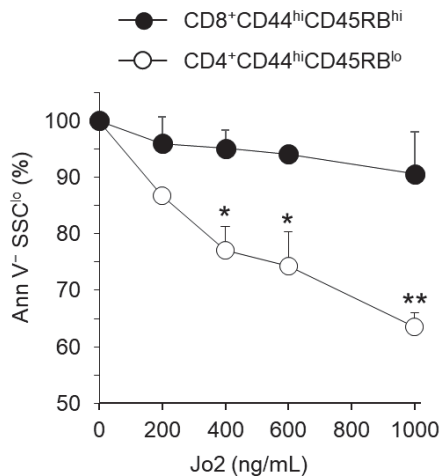


Figure 32 : Mort cellulaire induite par la voie Fas dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs/mémoires

Les lymphocytes T ont été traités pendant 2 heures à 37°C par différentes concentrations d'anticorps agonistes Jo2 : 0, 200, 400, 600 et 1000 ng/mL. Les cellules ont ensuite été marquées par l'annexine V, les anticorps fluorescents spécifiques de CD90, B220, CD4, CD8, CD44 et CD45RB ou par des isotopes contrôles. Les pourcentages de cellules vivantes (Ann V⁺SSC^{lo}) ont été évalués par cytométrie en flux dans les lymphocytes T effecteurs mémoires CD4⁺CD44^{high}CD45RB^{low} (○) et CD8⁺CD44^{high}CD45RB^{high} (●). (n ≥ 6 ; * : p ≤ 0.05 ; ** : p ≤ 0.01).

Afin d'évaluer une potentielle synergie entre les récepteurs P2X7 et Fas dans l'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, nous avons induit l'apoptose par la voie Fas/FasL dans des lymphocytes T provenant de souris B6 ou B6-P2X7KO (Figure 33). Comme dans l'expérience précédente, les lymphocytes T CD8⁺ étaient moins sensibles à l'apoptose induites par l'anticorps Jo2. Le taux basal de cellules apoptotiques (FSC^{low}SSC^{high} et caspase 8⁺) est moins élevé dans les cellules P2X7KO notamment dans les lymphocytes T CD4⁺ (~ 12 vs 22 %) probablement lié à la mort par libération d'ATP lors de la préparation et de l'incubation des cellules à 37°C. Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{low}, déficients ou non pour P2X7R, présentent des taux élevés d'apoptose après traitement par les anticorps Jo2 (Figure 33). En revanche, les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high} possèdent, aussi bien en présence qu'en absence de P2X7R, une grande résistance à l'apoptose induite par la voie Fas/FasL comme le montrent les changements limités des paramètres physiques des cellules (Figure 33 A) et la faible

activation des caspases initiatrices 8 (Figure 33 B) et effectrices 3 et 7 (résultats non présentés). Ces résultats ainsi que ceux des études présentées en pages 97 et 132, montrant que les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high} sont peu sensibles à la voie ATP/P2X7R et à l'origine des lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ des souris lupiques MRL/lpr et B6/lpr-P2X7KO, suggèrent que le rôle synergique des récepteurs Fas et P2X7 dans l'homéostasie des lymphocytes T se joue principalement au niveau des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high}.

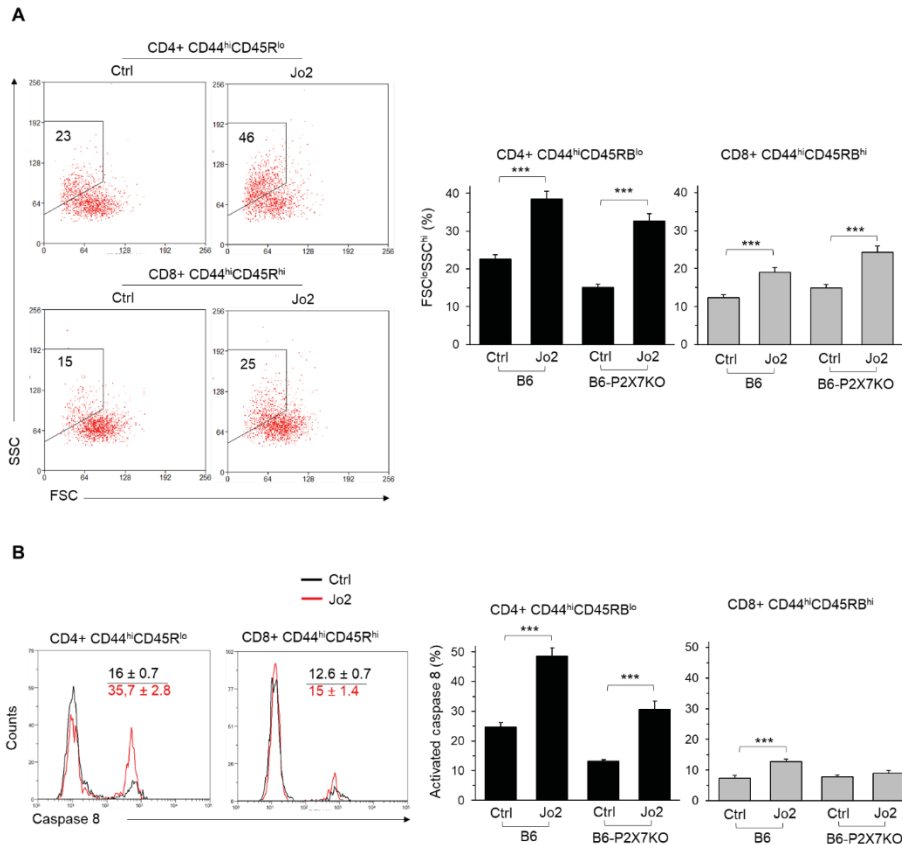


Figure 33 : Mort cellulaire induite par la voie Fas dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs/mémoires déficients ou non pour P2X7R

Les lymphocytes T ont été traités pendant 8 heures à 37°C en absence ou en présence de 1000 ng/mL d'anticorps Jo2. Les cellules ont été marquées par la sonde FLICA spécifique des caspases 8 activées, les anticorps fluorescents spécifiques de CD90, B220, CD4, CD8, CD44 et CD45RB ou par des isotypes contrôles. Le nombre de cellules apoptotiques a été évalué par cytométrie en flux en déterminant les pourcentages de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ FSC^{low}SSC^{high} (panel A) et caspase 8⁺ (panel B) aux stades effecteurs/mémoires CD44^{hi}CD45RB^{lo} et CD44^{hi}CD45RB^{hi} (n ≥ 6 ; *** : p ≤ 0.001).

.II.2 Diminution des taux de cFLIP dans les lymphocytes T déficients en P2X7R

Afin d'évaluer si le taux d'expression du récepteur Fas peut être impacté par l'activité de la voie ATP/P2X7R, nous avons mesuré son taux à la surface des lymphocytes T déficients ou non pour P2X7R. La

déficience en P2X7R ne semble pas affecter le taux d'expression en récepteurs Fas du moins au niveau du pool global de lymphocytes T (Figure 34). Il est cependant nécessaire de le vérifier au niveau des sous-populations de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ aux stades naïf et effecteur/mémoire.

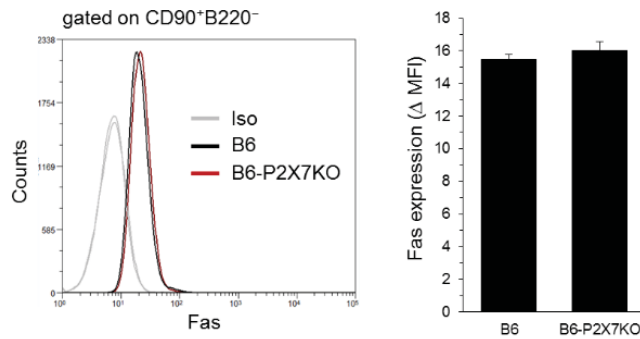


Figure 34 : Taux d'expression des récepteurs Fas à la surface des lymphocytes T des souris B6 et B6-P2X7KO

Les cellules spléniques des souris B6 et B6-P2X7KO âgées de 2 mois ont été marquées avec des anticorps spécifiques de molécules de surface : B220, CD90 et Fas ou par les isotypes contrôles. Les taux d'expression de Fas à la surface des lymphocytes T CD90⁺B220⁻ ont été mesurés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en $\Delta MFI = MFI_{Fas} - MFI_{Isotype}$. ($n \geq 6$ souris par groupe).

Cependant, les lymphocytes T des souris lupiques B6/lpr-P2X7KO et MRL/lpr ainsi que les souris B6-P2X7KO âgées de plus de 6 mois présentent des taux de molécules cFlip moins importants que les souris B6 ou B6-P2X7KO âgées de 2 mois (Figure 35). Cette diminution du taux d'expression de Flip est retrouvée dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ aux stades naïf et effecteur/mémoire (résultats non présentés). Cette diminution pourrait être due à un défaut d'activation des facteurs de transcription Foxo1 ou NFAT par la voie ATP/P2X7R.

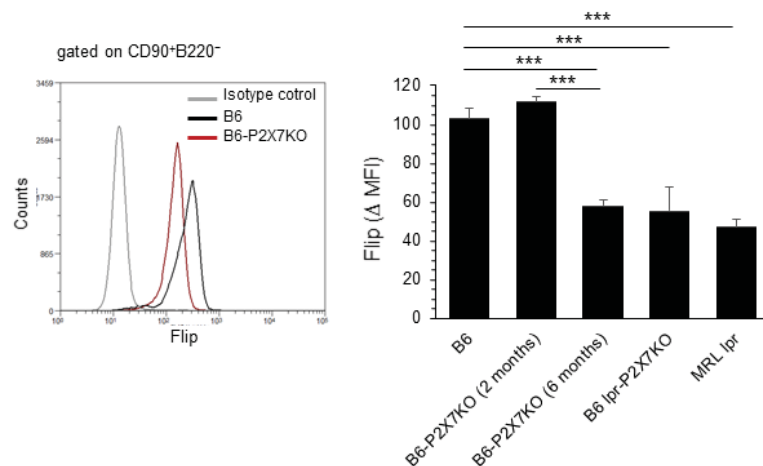


Figure 35 : Les lymphocytes T des souris lupiques et B6-P2X7KO âgées présentent des taux faibles en cFlip

Les cellules spléniques des souris MRL/lpr, B6, B6-P2X7KO, B6/lpr et B6-lpr/P2X7KO âgées de 2 ou 6 mois ont été marquées avec des anticorps dirigés contre cFlip, B220 et CD90 ou par des isotypes contrôles. Les taux intracellulaires de cFlip des lymphocytes T CD90⁺B220⁻ ont été mesurés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en $\Delta MFI = MFI_{cFlip} - MFI_{Isotype}$. ($n \geq 6$ souris par groupe ; *** : $p \leq 0.001$).

.II.3 Forte expression des ATPases CD73 sur les lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺

Nous avons montré que la faible capacité des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high} à induire les fonctions cellulaires (page 97 : ouverture de canaux cationiques, formation de pores non sélectifs, externalisation des PS, clivage de CD62L et induction d'apoptose) ainsi que celle des

lymphocytes T CD4⁺ récemment activés CD69⁺ à induire le clivage de CD62L (page 79) par la voie ATP/P2X7R n'étaient pas dues à un taux d'expression ou d'activité plus importants des ecto-ATPases CD39 et/ou CD73. Dans cet étude nous montrons qu'en plus d'un taux élevé en molécules CD69⁺ (résultats non présentés), les lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ présentent des taux extrêmement forts en ecto-ATPases CD73 mais pas CD39 dans les souris B6/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO (Figure 36) ce qui ne permet pas d'expliquer les résultats précédents de notre laboratoire sur la résistance des lymphocytes T pathogéniques DN B220⁺ à la voie ATP/P2X7R³³⁰. Le taux général de ces deux nucléotidases semble plus importants dans les souris lupiques B6/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO que saines et cela à tous les stades d'activation. Comme dans les souris saines, les taux de CD39 et CD73 augmentent du stade naif au stade effecteur/mémoire (Figure 36).

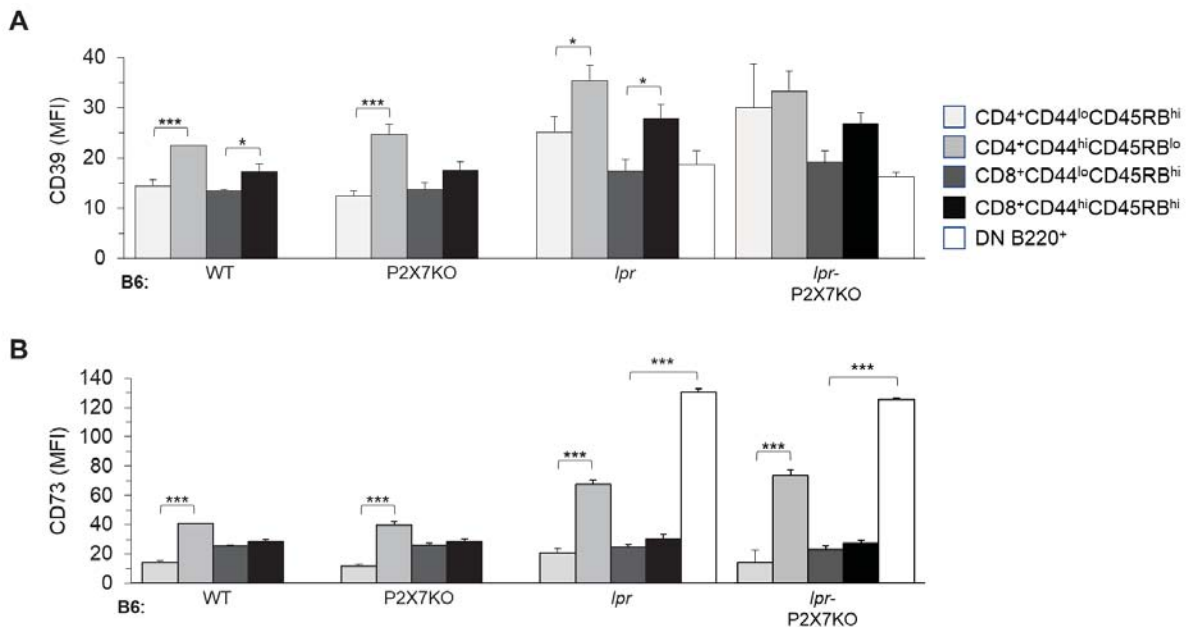


Figure 36 : Taux d'expression des ecto-ATPases CD39 et CD73 à la surface des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et DN B220⁺ des souris B6 déficientes pour Fas et/ou P2X7R.

Les cellules spléniques des souris B6, B6-P2X7KO, B6/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO âgées de 6 mois ont été marquées par des anticorps dirigés contre les molécules CD90, B220, CD4, CD8, CD44, CD45RB, CD39 et CD73. Le taux d'expression des ecto-ATPases CD73 et CD39 est mesuré par cytométrie en flux (MFI) à la surface des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD44^{lo}CD45RB^{hi}) ou effecteurs/mémoires (CD44^{hi}CD45RB^{lo}), des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (CD44^{lo}CD45RB^{hi}) ou effecteurs/mémoires (CD44^{hi}CD45RB^{hi}) ou pathogéniques DN B220⁺. (n ≥ : 6 ; * : p ≤ 0.05 ; *** : p ≤ 0.001).

.II.4 Fonctions cellulaires et taux d'expression de P2X7R dans les lignées cellulaires

L'expression de P2X7R à la surface des lignées lymphocytaires T a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un sérum polyclonal et d'anticorps monoclonaux (Figure 37 et résultats non présentés). Les lignées humaines Jurkat, J45.05, HPB-ALL et MOLT-4 présentent peu ou pas de récepteurs P2X7 à leur

surface (Figure 37). Cette absence du récepteur P2X7 est associée à celle des fonctions cellulaires telles que la formation des pores non sélectifs, l'externalisation des PS (Figure 39 et résultats non présentés) ou l'ouverture de canaux ioniques (Figure 38 et résultats non présentés).

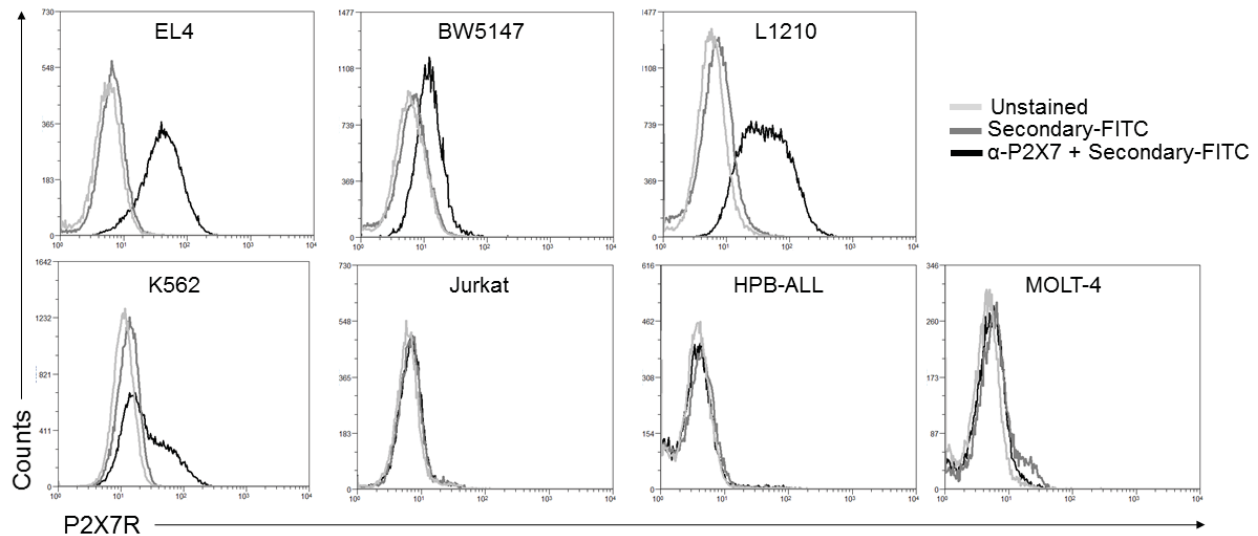


Figure 37: Taux d'expression de P2X7R à la surface des lignées lymphocytaires T

Analyse par cytométrie en flux de l'expression du récepteur P2X7 à la membrane plasmique des lignées lymphocytaires T: EL 4, BW5147, L1210, K562 Jurkat, HPB-ALL et MOLT-4. Les courbes de couleur gris clair correspondent aux cellules non marquées, celles en gris sombre aux cellules incubées uniquement avec l'anticorps secondaire et celles en noir aux cellules incubées avec les anticorps anti-P2X7R puis avec les anticorps secondaires.

Les lignées lymphocytaires T murines EL4, BW5147 et L1210 expriment toutes P2X7R à leur surface mais à des taux différents. Ainsi, les cellules de la lignée BW5147 expriment faiblement le récepteur P2X7 (Figure 37) alors que les cellules des lignées L1210 et EL4 possèdent des taux élevés de P2X7R à leur membrane plasmique (Figure 37). De façon inattendue, les taux d'expression en P2X7R ne corrèlent pas avec ceux des fonctions cellulaires induites par l'ATP. Ainsi, les cellules de la lignée EL4, exprimant des taux élevés en P2X7R, induisent très efficacement l'ouverture des canaux cationiques P2X7R en réponse à l'ATP mesurée dans la Figure 38 par les influx calciques. De plus, environ 200 secondes après l'ouverture du canal, les cellules EL4 forment des pores plus larges causant une entrée massive d'ions Ca^{2+} augmentant alors la pente des influx calciques (Figure 38). L'ouverture des canaux et des pores P2X7R est continue et ne s'atténue pas avec le temps ce qui confirme l'absence de désensibilisation des P2X7R. L'influx calcique généré en réponse à l'ATP est indépendant du réticulum endoplasmique car il augmente même avec l'inhibition des pompes SERCA par la thapsigargine et cela avant ou après traitement des cellules à l'ATP (Figure 38). La formation des pores non sélectifs dans la lignée EL4 est confirmée par cytométrie en flux (Figure 39). La lignée EL4 externalise également de façon efficace les PS en réponse à l'ATP (Figure 39).

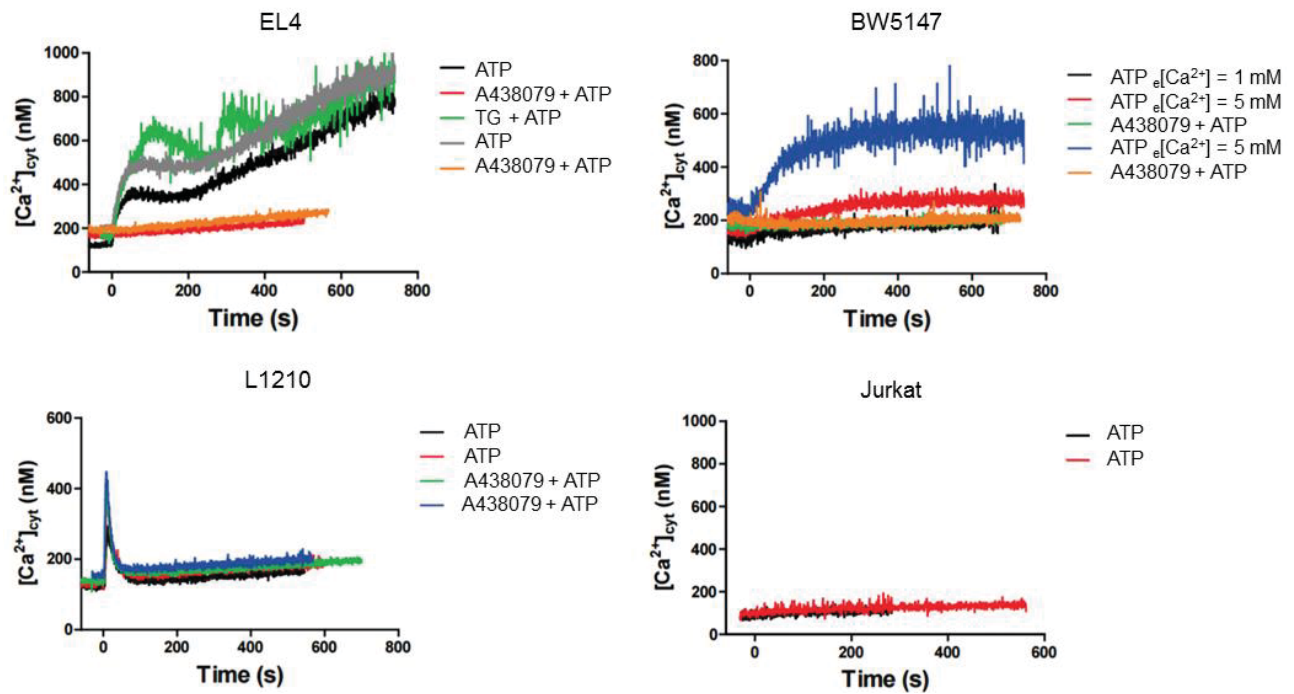


Figure 38: Influx calcique induit par la voie ATP/P2X7R dans les lignées lymphocytaires T

Quantification par fluométrie de l'ouverture de canaux cationiques en mesurant les influx calciques dans le cytosol des lignées lymphocytaires T EL4, BW5147, L1210 et Jurkat. L'axe des abscisses et des ordonnées présentent, respectivement, la concentration cytosolique de Ca^{2+} (nM) et le temps (secondes) de stimulation par l'ATP. La formation des pores a été évaluée en stimulant par $500 \mu M$ d'ATP des cellules prétraitées ou non avec $10 \mu M$ de l'inhibiteur spécifique de P2X7R, A438079. La non implication du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique dans l'influx observé a été contrôlée par le traitement des cellules avec l'inhibiteur des pompes Ca -ATPase (SERCA), la thapsigargine.

La lignée BW5147, présentant de faibles taux d'expression de P2X7R (Figure 37), induit efficacement l'externalisation des PS (Figure 39) et la formation des canaux cationiques dont le taux augmente avec la concentration du Ca^{2+} extracellulaire (Figure 38). Cependant, les cellules de cette lignée n'ont pas la capacité d'induire l'ouverture des pores non sélectifs en réponse à l'ATP comme le montre l'absence d'incorporation de YO-PRO-1 (Figure 39) et de changement de pentes des influx calciques (Figure 38). De façon inattendue, la lignée L1210 exprimant des taux très élevés en P2X7R (Figure 37), n'induit aucune des fonctions cellulaires dépendantes du récepteur P2X7 (Figure 39 et Figure 38). Nous tentons actuellement de définir l'origine de cette absence de réponse de P2X7R à l'ATP.

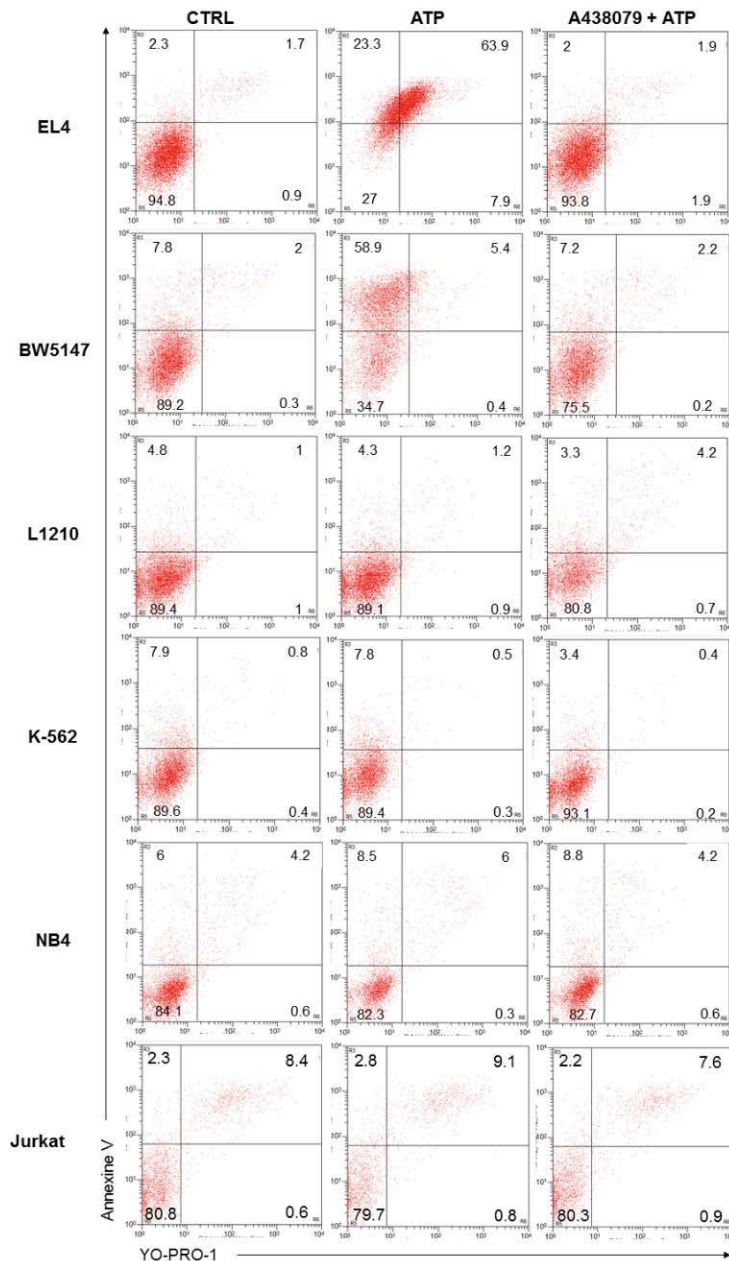


Figure 39 : Externalisation des phosphatidylsérines et formation de pores non sélectifs dans les lignées lymphocytaires T en réponse à l'ATP

Analyse par cytométrie en flux du taux d'externalisation des PS (annexin V-PE) et de formation des pores non sélectifs (YO-PRO-1). L'axe des abscisses et des ordonnées présentent, respectivement, le taux de marquage par annexine V et l'incorporation du YO-PRO-1 par les cellules. Les fonctions cellulaires ont été évaluées en absence (CTRL) ou en présence d'ATP (500 μ M pendant 30 minutes) ainsi qu'en présence ou pas de l'inhibiteur spécifique de P2X7R, A438079, à 10 μ M. Les figures sont représentatives d'au moins 10 expériences indépendantes.

.II.5 Absence d'anomalies dans l'expression P2X7R dans les lignées cellulaires

Le récepteur P2X7 peut être exprimé sous deux isoformes différentes chez la souris, a ou k, selon l'expression des exons 1 ou 1' dans la région NH2-terminale²⁸⁴ (paragraphe .IV.3.b, page 57). Nous avons postulé que les différences observées dans l'induction des fonctions cellulaires pourraient être dues à des différences d'expression en isoformes de P2X7R ou à la présence de mutations dans les parties codantes du gène *p2rx7*. Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons donc amplifié et séquencé les ADNc fabriqués à partir des ARNm extraits des lignées lymphocytaires T à l'aide des amorces présentées au Tableau 5.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour amplifier et séquencer l'ADNc de *p2x7r* des différentes lignées lymphocytaires T

Couples d'amorces	séquence sens (5'-3')	séquence anti-sens (5'-3')	régions amplifiées et séquencées	Taille des amplimères (pb)
C1	AAATCGGTGTGTTTCCTTTGGC	CTGGATCCGGGTGACTTTGTTT	partie N-ter de P2X7a: UTR 5'-exon1-exon2	172
C2	AGACTACACCTTCCCTTTGCAG	TGGCAAGATGTTTCTCGTGTA	boucle extra-cellulaire (N-ter)	358
C3	TAATATCCACTTCCCCGGCC	CCTGAACTGCCACCTCTGTA	boucle extra-cellulaire (milieu)	164
C4	TACAGAGGTGGCAGTTCAGG	ATCAACGTCCTGTTTCCAC	boucle extra-cellulaire (C-ter)	204
C5	CTGACTCCTGGACAATCTGAGG	TCTTCAACACAGCTTACGAGGG	Partie C-ter: exon13-UTR 3'	553
C6	ATGCAGCCATAAATCCGGGAAA	GCGTCCCGATCCATATGCTATG	partie N-ter de P2X7k: exon1'-exon2	56

.II.5.a Les lignées lymphocytaires T murines expriment les ARNm des isoformes P2X7 a et k

L'amplification par PCR et le séquençage des exons 1 et 1' (UTR 5') du brin « sens » à l'aide des amorces présentées dans le Tableau 5 a montré que les lignées lymphocytaires T EL4, BW5147 et L1210 expriment les ARNm des deux isoformes a et k de P2X7R (Figure 40 et résultats non présentés). Le séquençage de la boucle extracellulaire et de la queue C-terminale n'ont montré aucune délétion ou mutation par rapport à la séquence de référence du gène *p2rx7* (non présentés). Il est nécessaire d'effectuer le séquençage des brins « anti-sens » de cette région.

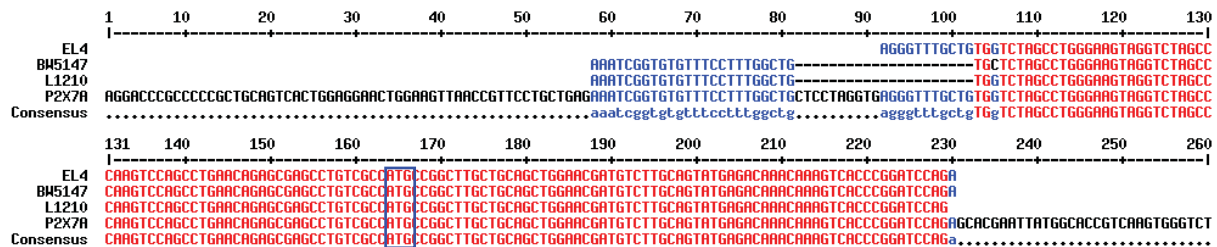


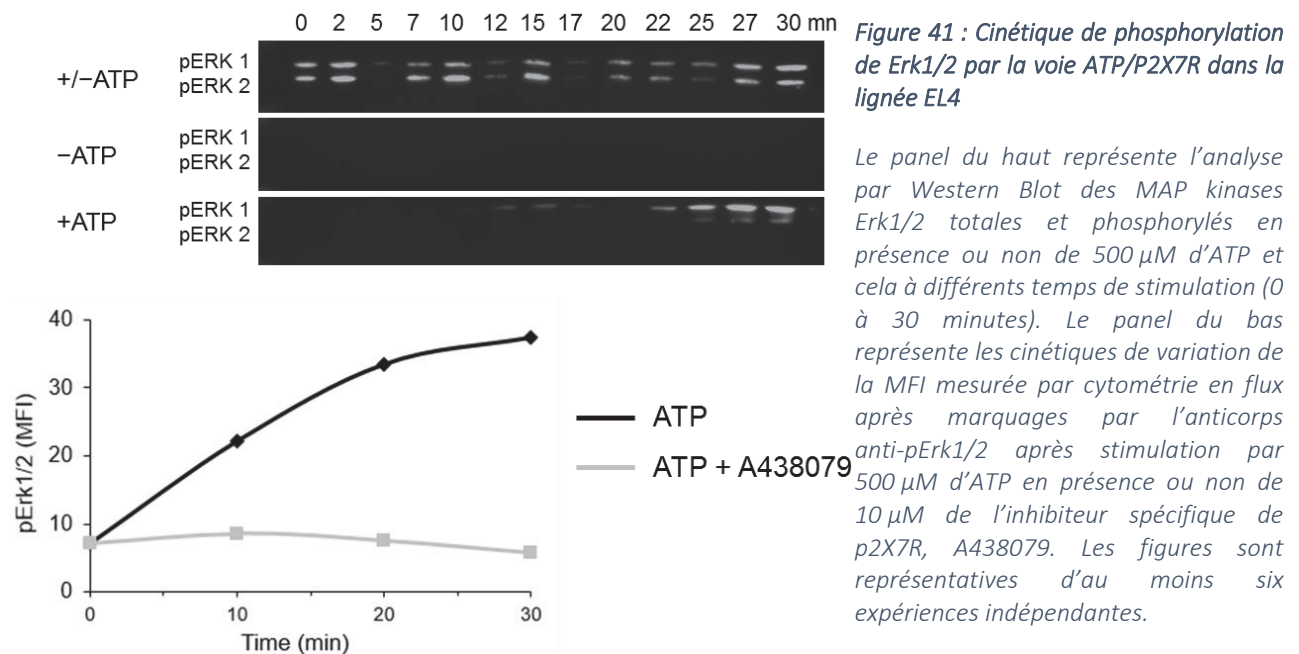
Figure 40 : Alignement des séquences des produits de PCR de l'exon 1 du *p2rx7* (UTR 5') des lignées cellulaires. Le codon d'initiation de la traduction est encadré en bleu.

Des anticorps monoclonaux spécifiques de la région N-terminale des récepteurs P2X7a et P2X7k sont en cours de développement par notre laboratoire et seront utilisés pour quantifier les taux d'expression des deux isoformes de P2X7R dans les lignées cellulaires ainsi que dans les sous-populations lymphocytaires T des différentes lignées de souris étudiées.

.II.6 Cinétique d'activation de la MAP kinase Erk par la voie ATP/P2X7R

Erk1/2, étant impliquée dans la prolifération et la survie des lymphocytes T, nous avons mesuré son taux de phosphorylation (pErk1/2) dans la lignée lymphocytaire T EL4 traitée ou non par de l'ATP (Figure 41). Le taux de phosphorylation de Erk1/2 n'est que légèrement diminué en présence d'1 mM de Cadmium,

un inhibiteur des canaux calciques (non présenté), ce qui est en accord avec une étude montrant que l'activation des récepteurs P2X7 par l'ATP induit la phosphorylation des MAP kinases Erk et JNK indépendamment de l'influx calcique ⁴²³. Nous déterminerons le taux de phosphorylation d'Erk1/2 également dans les lignées BW5147 et L1210 afin de vérifier si les lignées présentent, comme pour les autres fonctions cellulaires, des capacités différentes de phosphorylation en réponse à l'ATP. Cela pourrait également ouvrir des voies d'investigations dans le rôle de P2X7R dans la survie des lymphocytes T et éventuellement leur apoptose par la voie Fas/FasL.



Les lignées murines EL4, L1210 et BW5147 n'exprimant pas de récepteurs Fas (résultats non présentés), nous les transfecterons par un vecteur d'expression codant ce récepteur afin d'étudier les interactions entre les voies Fas/FasL et ATP/P2X7R.

.II.7 Analyse du transcriptome de la rate des souris déficientes pour P2X7R et/ou Fas

Afin d'identifier les gènes et les voies biochimiques responsables du syndrome ALPS développé par la lignée de souris B6/*lpr*-P2X7KO, les ARN totaux ont été extraits des cellules spléniques et des ganglions lymphatiques des souris des lignées B6/*lpr*-P2X7KO et auto-immunes MRL/*lpr* (avant et après le développement de la maladie) ainsi que des souris des lignées contrôles B6, B6/*lpr* et B6-P2X7KO. Le séquençage des ARNm (RNA-seq) issus des cellules spléniques des 5 lignées à différents âges a ensuite été réalisé sur une plateforme de séquençage à haut débit. Les données de RNA-seq ont été analysées par

l'équipe de bio-informaticiens du Professeur Yao-Ting Huang (université de Chung-Cheng, Taïwan) afin d'identifier l'ensemble des gènes différentiellement exprimés entre les cellules spléniques des lignées de souris suivantes : 1) MRL/lpr saines et MRL/lpr malades ; 2) MRL/lpr saines et B6/lpr-P2X7KO ; 3) MRL/lpr malades et B6/lpr-P2X7KO ; 4) B6 et MRL/lpr saines 5) B6 et MRL/lpr malades ; 6) B6 et B6/lpr-P2X7KO ; 7) B6 et B6-P2X7KO ; 8) B6/lpr-P2X7KO et B6-P2X7KO ; 9) B6/lpr et MRL/lpr saines 10) B6/lpr et MRL/lpr malades ; 11) B6/lpr et B6/lpr-P2X7KO ; 12) B6/lpr et B6-P2X7KO. Un nombre total de 387 gènes a été identifié comme exprimé différentiellement entre ces différentes lignées de souris (Tableau 6). L'analyse globale du transcriptome des organes lymphoïdes (RNA-seq) des souris B6/lpr a également été réalisée mais la comparaison bio-informatique avec les autres lignées de souris reste encore à faire.

Tableau 6 : Nombre de gènes exprimés différentiellement dans la rate des 5 lignées de souris.

	B6-P2X7KO	B6/lpr-P2X7KO	MRL/lpr (2 mois)	MRL/lpr (5 mois)
B6	124	43	17	30
B6-P2X7KO	-	68		
B6/lpr-PX7KO	-	-	41	40
MRL/lpr (2 mois)	-	-	-	40

Comme le montre le Tableau 6, le développement du syndrome lupique chez les souris MRL/lpr (MRL/lpr 2 mois versus MRL/lpr 5 mois) s'accompagne de la surexpression ou sous-expression d'au moins 37 gènes. De même, de 37 à 40 gènes (selon l'âge des souris MRL/lpr) sont exprimés différentiellement entre les deux lignées de souris lupiques MRL/lpr et B6/lpr-P2X7KO. Il est maintenant important de déterminer de quelle façon ces gènes participent aux différences observées entre les modèles MRL/lpr et B6/lpr-P2X7KO dans le développement et/ou la sévérité du syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité. Il est également intéressant de noter que l'inactivation du gène P2X7 dans le fond génétique B6 (B6 versus B6-P2X7KO) entraîne à elle seule la surexpression ou la sous expression de plus de 120 gènes, non répertoriés à ce jour dans cette lignée de souris, alors même qu'elle ne présente pas de phénotype particulier du moins en termes de durée de vie et de reproduction qui sont équivalentes aux souris B6 « *wild type* » ou encore en termes d'auto-immunité ou de déficit immunitaire.

.II.8 Validation des gènes par QPCR et analyses fonctionnelles

Parmi ces 387 gènes exprimés différemment, nous en avons sélectionné 31 (33 avec les différentes isoformes) pour une analyse plus approfondie (Tableau 7). Ces gènes ont été sélectionnés sur la base de leur importance immunologique après une analyse exhaustive de la littérature scientifique internationale. Ils sont impliqués dans l'activation, la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules immunitaires. L'expression différentielle de ces 33 gènes (plus 6 gènes de « ménage » comme contrôle interne de l'expérience) a d'abord été vérifiée par une analyse en RT-PCR quantitative (méthode Taqman) sur des ARNm extraits d'organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) provenant des 6 lignées de souris étudiées dans ce projet (B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO, B6/*lpr*-P2X7KO et MRL/*lpr* malades et saines). Six souris individuelles ont été analysées pour chacune des 7 lignées et conditions étudiées. À notre grande satisfaction, les expériences de RT-PCR quantitative ont permis de valider les résultats de RNA-seq avec des variations du taux d'expression atteignant, comme attendu pour certains des gènes analysés, un facteur 10 entre les lignées de souris. Les résultats obtenus dans les expériences de RT-PCR quantitative sont résumés sous forme de *heatmaps* des taux d'expression des 33 gènes dans chaque souris individuelle (Figure 42) et des moyennes d'expression de ces gènes dans chaque groupe de souris (Figure 43).

Le *clustering* des données de RT-QPCR a permis de regrouper les souris en trois groupes différents constitués : **1**) de souris des lignées saines B6 et B6P2X7KO (Figure 42) ; **2**) majoritairement des souris B6/*lpr* et MRL/*lpr* jeunes dont les atteintes lupiques sont légères ; **3**) essentiellement des souris B6/*lpr*-P2X7KO et MRL/*lpr* malades (Figure 42). Les gènes étudiés sont également regroupés en 4 groupes : **1**) le premier est composé de gènes surexprimés majoritairement par les souris portant la mutation *lpr* du gène *fas* de fond génétique MRL ou B6 ; **2**) le deuxième comporte les gènes sous-exprimés par les souris portant la mutation *lpr* dans des fonds génétiques MRL et B6 ; **3**) le troisième comporte les gènes surexprimés dans les souris présentant des atteintes intermédiaires ou fortes (B6/*lpr*, B6/*lpr*-P2X7KO et MRL/*lpr*) et les gènes sous-exprimés par les souris saines (B6 et B6-P2X7KO) ; **4**) le quatrième regroupe les gènes surexprimés par les souris peu atteintes et sous exprimés par les souris lupiques (MRL/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO) (Figure 42). Ces regroupements sont confirmés en moyennant les taux d'expression des gènes dans chaque lignée (Figure 43). Enfin et afin de mieux comprendre les mécanismes du développement et de l'évolution du LED dans les souris MRL/*lpr*, des études comparatives d'expression de ces gènes ont été réalisées séparément entre les souris MRL/*lpr* avant (âgées de 2 mois) et après (âgées de 4 mois) le développement de la maladie (non présenté).

Tableau 7 : Liste des gènes analysés par QPCR et description brève des fonctions connues de leurs protéines

Symbol du gène	Noms du gène	Description
4931406B18 Rik	RIKEN cDNA 4931406B18 gene, Ortholog SIGLECL1	Une protéine de surface exprimée à la surface des cellules immunitaires et dont le ligand est l'acide sialique. Les SIGLEC possèdent majoritairement des domaines ITIM en intracellulaire et des domaines Ig de type V en extracellulaire.
Adgrb1	adhesion G protein-coupled receptor B1, Tim4, Bai1, B1	Un RCPG défini comme récepteur des PS impliqué dans la phagocytose des corps apoptotiques (Miyanishi et al., 2007; Park et al., 2007).
Bcl2l1	BCL2-like 1, bcl-x, BclX, Bcl-XL, Bcl(X)L, Bcl-Xs	Protéine antiapoptotique. Elle inhibe les caspases proapoptotiques ainsi que celles impliqués dans l'inflammasome (maturation de l'IL-1 β). Les souris Bcl2l1 ^{-/-} meurent au 13 ^{ème} jour de leur vie embryonnaire. Un dysfonctionnement Bcl2l1 entraîne des déficiences dans le système immunitaire.
Bcl2l14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator), Bcl2-L-14, Bclg, Apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14	Protéine proapoptotique exprimée sous 3 isoformes différentes.
Btnl10	butyrophilin-like 10, Butyrophilin-like protein 10, Butr1, BUTR-1, Human Ortholog BTN10, butyrophilin like 10	Protéine de la superfamille des Ig ayant beaucoup de similitudes avec les protéines de costimulation et de coinhibition (B-7, ICOS, PD-L2, PD-L2...). La famille des Btnl est impliquée dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T en périphérie.
C2cd4a	C2 calcium-dependent domain containing 4A, EG244911, Fam148a, Nuclear localized factor 1 (NFL1)	Identifiée comme facteur de risque pour le diabète de type I, la famille des CDC24A et B est impliquée dans des processus pro-inflammatoires (Warton K et al, 2004; O'Hare EA et al, 2016).
Ccr4	chemokine (C-C motif) receptor 4,	Un RCPG exprimé à la surface des lymphocytes T mais pas celle des lymphocytes B, les monocytes et les granulocytes (Imai et al, 1997). Il joue un rôle dans le recrutement des lymphocytes Treg dans les foyers inflammatoires (Oo et la, 2010). La déficience en CCR4 réduit la mortalité, la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β après administration de LPS.
Ceacam20	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 20	Son activation pas les tyrosine kinase (Src et Syk : spleen tyrosin kinase) induit l'expression de l'IL-8 par l'activation du facteur de transcription NF-kb. Ceacam20 jouerait également un rôle anti-inflammatoire dans l'immunité des épithéliums (Murata Y et al, 2015).
Chil3	chitinase-like 3, Chi3l3, Ym1, ECF-L, AI505981	Une enzyme principalement impliquée dans la production des glucides chitines. La chitine a propriétés chimiotactiques pour les lymphocytes T, les éosinophiles et les cellules de moelle osseuses (Di Rosa et al, 2016).
Chst4	carbohydate (chondroïtin 6/keratan) sulfotransferase 4	Enzyme impliqué dans la synthèse des ligands de CD62L. Elle joue un rôle important dans la migration des lymphocytes T lors des inflammations chroniques. Les souris déficientes pour Chst4 ont un déficit de homing des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Hemmerich et al, 2001; Kawashima et al, 2009; Uchimura et al, 2010).
Cr2	complement receptor 2, C3DR, CD21, CD35, Cr1, Cr-1, Cr-2, EBV receptor	Locus de susceptibilité au lupus (Wu et al 2007). La déficience en Cr2 entraîne des déficiences immunitaires dépendantes des lymphocytes T en entraînant une faible affinité aux antigènes et un déficit dans le développement des lymphocytes B mémoires et des centres germinatifs.
Ctse	cathepsin E	Protéinase exprimée par des cellules immunitaires et impliquée dans la présentation antigénique et la sélection thymique. La déficience en Ctse cause des désordres métaboliques, d'autophagie et des lésions cutanées ressemblant à la dermatite atopique humaine au niveau de la tête, les oreilles, la nuque et le dos.
Fcamr	Fc receptor; IgA; IgM; high affinity (CD351)	Récepteur de haute affinité des domaines Fc des IgA et IgM. Les souris déficientes pour Fcamr présentent des centres germinatifs très développés et favorise la commutation de classe en IgG3 après stimulations des lymphocytes T (Shibuya et al, 2000)
Gpc6	glypican 6	Protéine à encre GPI impliquée dans la régulation des voies de transductions du signal. Elle est directement régulée par le facteur de transcription NFAT (Yiu et al, 2011).
H2-Ea-ps	histocompatibility 2; class II antigen E alpha; pseudogene	Molécule d'histocompatibilité de type II présente chez les souris de fond génétique MRL mais pas chez celles du fond B6.
Lcn2	lipocalin 2, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin 2	Protéine de trafic de fer impliquée dans l'apoptose, l'immunité innée et le développement des reins. Les souris déficientes pour Lcn2 sont plus sensibles aux infections bactériennes. Les souris hétérozygotes présentent un déficit d'apoptose dans les cellules hématopoïétiques.
Ms4a1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 B-lymphocyte antigen CD20, B1	Molécule de surface exprimée par les lymphocytes B du stade pré-B précoce jusqu'au stade des plasmocytes. Elle est impliquée dans la régulation, l'activation et la prolifération des lymphocytes B.

Pigr	polymeric immunoglobulin receptor	Récepteur des IgA et des IgM à la surface basolatérale des cellules épithéliales. Les souris déficientes pour Pigr présentent des taux sériques élevés en IgA, des fuites mucoales et présentes des infections mycobactériennes.
Lppr4	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4, plasticity-related gene 1 protein (PRG-1)	Phosphatase de phospholipides responsable de la catalyse de médiateurs tels que l'acide lysophosphatidique (LPP), l'acide phosphatidique et la S1P impliquée dans la circulation des cellules immunitaires.
Retnlg	resistin like gamma, Fizz3, Relmg, Xcp1	Exprimée principalement par les monocytes, Retnlg est impliquée dans la sécrétion de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α par l'intermédiaire du facteur NF- κ B. Elle augmente également l'expression d'ICAM1, de VCAM1 et CCL2 impliqués dans le recrutement des leucocytes dans les foyers inflammatoires.
Rftn2	raftlin family member 2, raftlin lipid raft linker 1	Exprimée au niveau des raft des lymphocytes B, des DC et des cellules épithéliales. Elle est essentielle pour l'activité et l'internalisation des TLR3, TLR4 et TICAM-1 dans les DC et les macrophages (Watanabe et al, 2011; Tatemasu et al, 2014; Tatemasu et al, 2016).
Rgs13	regulator of G-protein signaling 13	Inhibiteur protéines G et des voies de signalisation induites par les GTPases. Les souris déficientes pour Rgs13 présentent une augmentation de la dégranulation des mastocytes et de chocs anaphylactiques (Shi et al, 2002; Bansal et al, 2008; lwaki et al, 2011).
Rgs18	regulator of G-protein signaling 18	Inhibiteur des protéines G et des voies de signalisation induites par les GTPases. Les souris déficientes pour Rgs18 présentent un nombre important de plaquettes sanguines et un temps réduit de coagulation sanguines (Delesque-Touchard et al, 2014; Alshbool et al, 2015).
Rorb	RAR-related orphan receptor beta, NR1F2	Facteur de transcription et récepteur d'hormones. Impliqué dans plusieurs processus biologiques tels que le cycle circadien, le développement du SNC et la différenciation des ostéoblastes... (Jetten et al 2004)
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A), 60BBAg, B8Ag, Caga, CFAg, CP-10, MRP8, p8	Protéine impliquée dans la régulation de certains processus inflammatoires et la réponse immunitaire notamment l'activation, la migration et l'adhérence des leucocytes. Elle jouerait un rôle proinflammatoire (sécrétion de cytokines et de chimiokines inflammatoires, TLR4...), dans la migration des leucocytes (alarmine, DAMP...), dans l'immunité antimicrobienne (par la chélation de Zn ²⁺), antioxydant et proapoptotique (par les ROS). La déficience en S100a8 induit une létalité embryonnaire.
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Impliquée dans la biosynthèse des lipides. Son absence atténue l'obésité, l'insulinorésistance et les stéatoses induites par des régimes riches en calories. Elle induit également des athéroscléroses et des inflammations au niveau du foie, de l'intestin, du pancréas... Scd1 jouerait un rôle antiinflammatoire (Brown et al, 2010; Liu et al, 2011; Zhang et al, 2012).
Sema7a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7A serine (or cysteine)	Exprimée par les lymphocytes activés et les érythrocytes, SEMA7A joue un rôle important dans signalisations induite par les intégrines. Elle est impliquée dans l'activation et la migrations des lymphocytes T et les macrophages à travers l'intégrine α -1- β -1. Elle jouerait un rôle régulateur au niveau des lymphocytes T. Les souris déficientes pour SEMA7A présentent des effets accentués de l'EAE (Czopik et al. 2006; Suzuki et al. 2007).
Serpinb9b	peptidase inhibitor; clade B; member 9b	Dans le système immunitaire, la Serpinb9 inhibe les protéases des granules de leucocytes telles que les Granzymes (Sun et al, 1997; Stout-Delgado et al, 2007; Kaiserman et al, 2012).
Sit1	suppression inducing transmembrane adaptor 1, SHP2-interacting transmembrane adapter protein	Sit1 régule négativement la voie de signalisation du TCR. Elle est impliquée dans la sélection positive des lymphocytes T. La déficience en Sit1 affecte le développement des lymphocytes T et induit une hyperplasie du thymus, une diminution du nombre des lymphocytes dans les gangions lymphatiques et une susceptibilité de développer des encéphalomyélites auto-immunes.
Timd2	T cell immunoglobulin and mucin domain containing 2	Récepteur potentiel du SEMA4A, impliqué dans la régulation des lymphocytes T. Les souris déficientes pour Tim2d présentent des réponses inflammatoires exacerbées (Kumanogoh et al, 2002).
Wfdc21	WAP four-disulfide core domain 21, Wdm1-like, 1100001G20Rik Human Ortholog WFDC21P, pseudogene also known as LNCDC; linc-DC; linc-DC	Long ARN non codant impliqué dans la régulation et la différenciation des cellules immunitaires comme les DC. Dans les DC, ce processeur passerait par la régulation de transcription de STAT3 (Wu et al, 2008; Wang et al, 2014).

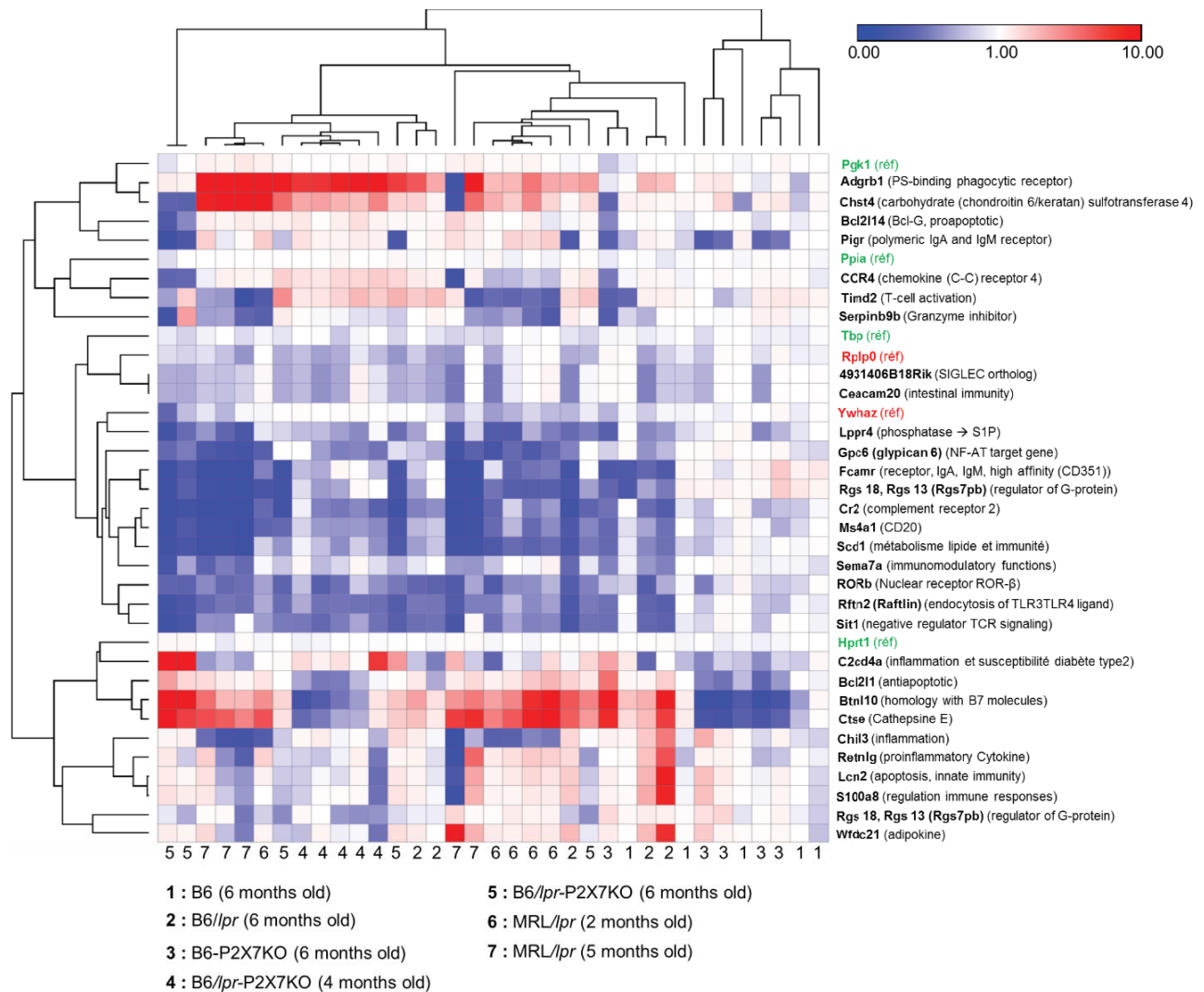


Figure 42 : Heatmap de l'analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de 36 gènes dans la rate de 35 souris individuelles

Analyse par la méthode Taqman de l'expression différentielle des 36 gènes dans les cellules spléniques de 5 souris des groupes suivants (1) : B6 âgées de 6 mois ; (2) : B6/lpr âgées de 6 mois ; (3) : B6-P2X7KO âgées de 6 mois ; (4) : B6/lpr-P2X7KO âgées de 4 mois ; (5) : B6/lpr-P2X7KO âgées de 6 mois ; (6) : MRL/lpr âgées de 2 mois ; (7) : MRL/lpr âgées de 5 mois. Les noms des gènes de référence utilisés ou écartés lors de la normalisation des analyses sont marqués, respectivement, en vert et en rouge.

.II.9 Caractérisation des souris B6-P2X7KO^{Foxp3-Cre}

.II.9.a Augmentation du nombre de lymphocytes Treg chez les souris B6-P2X7KO^{Foxp3-Cre}

Afin de déterminer dans quel type cellulaire et/ou à quel stade de différenciation P2X7R est impliqué dans l'homéostasie des lymphocytes T en synergie avec Fas, nous avons entrepris la construction de souris B6 invalidées pour P2X7R de façon conditionnelle dans les lymphocytes Tconv CD4⁺ et CD8⁺, les lymphocytes Treg et les DC (paragraphe .I.10, page 183). Les souris invalidées pour P2X7R dans les lymphocytes Treg (B6-P2X7KO^{Foxp3-Cre}) issu du croisement entre les souris B6 *floxées* et les souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *foxp3* (B6^{Foxp3-Cre}). Les souris B6^{Foxp3-Cre} sont utilisées comme contrôle car elles expriment un taux normal de P2X7R la surface des lymphocytes T aussi bien conventionnels que régulateurs (Figure 44). Comme attendu, les lymphocytes Treg Foxp3⁺ des souris B6-P2X7KO^{Foxp3-Cre} ont perdu totalement l'expression de P2X7R à leur surface comparée à celle des souris contrôles B6^{Foxp3-Cre} alors que les taux de P2X7R ne sont pas affectés sur les lymphocytes Tconv des souris B6-P2X7KO^{Foxp3-Cre} et sont similaires à ceux des souris contrôles B6^{Foxp3-Cre} (Figure 44).

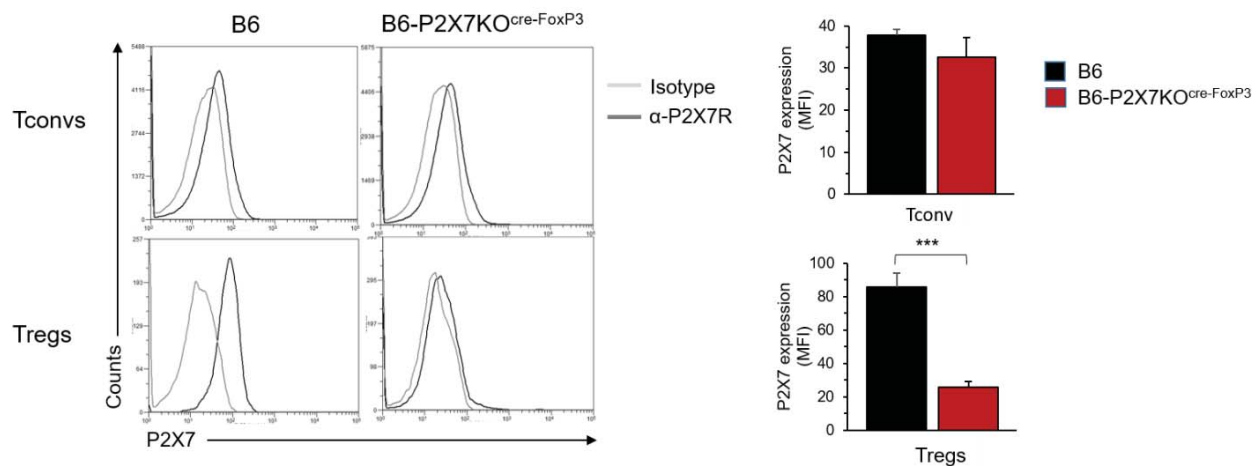


Figure 44 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de P2X7R à la surface des lymphocytes Treg et Tconv des souris B6^{Foxp3-Cre} et B6-P2X7KO^{Foxp3-Cre}

Comme attendu, les lymphocytes Treg de la lignée B6-P2X7KO^{CreFoxp3} ont totalement perdu la capacité d'induire l'ouverture des pores non sélectifs mesurée par l'incorporation de la sonde YO-PRO-3, l'externalisation des PS évaluée par un marquage annexine V et le clivage des molécules CD62L (Figure 45). Ainsi, le pourcentage de lymphocytes Treg YO-PRO-3⁺, annexine V⁺ et CD62L⁺ reste le même en présence ou en absence d'ATP (Figure 45) démontrant que les souris B6-P2X7KO^{CreFoxp3} sont bien déficientes pour

P2X7R de façon spécifique au niveau des lymphocytes Treg. À l'inverse, les lymphocytes Tconv CD4⁺ des souris B6-P2X7O^{Foxp3-Cre} induisent efficacement les fonctions cellulaires en réponse à une stimulation par l'ATP avec un pourcentage de cellules YO-PRO-3⁺ qui passe de 10 % à 44 % après stimulation par l'ATP (Figure 45), de lymphocytes annexine V⁺ qui passe de 10 % à 51 % en présence d'ATP et enfin de lymphocytes T CD62L⁺ qui passe de 68 % à 26 % après traitement à l'ATP (Figure 45).

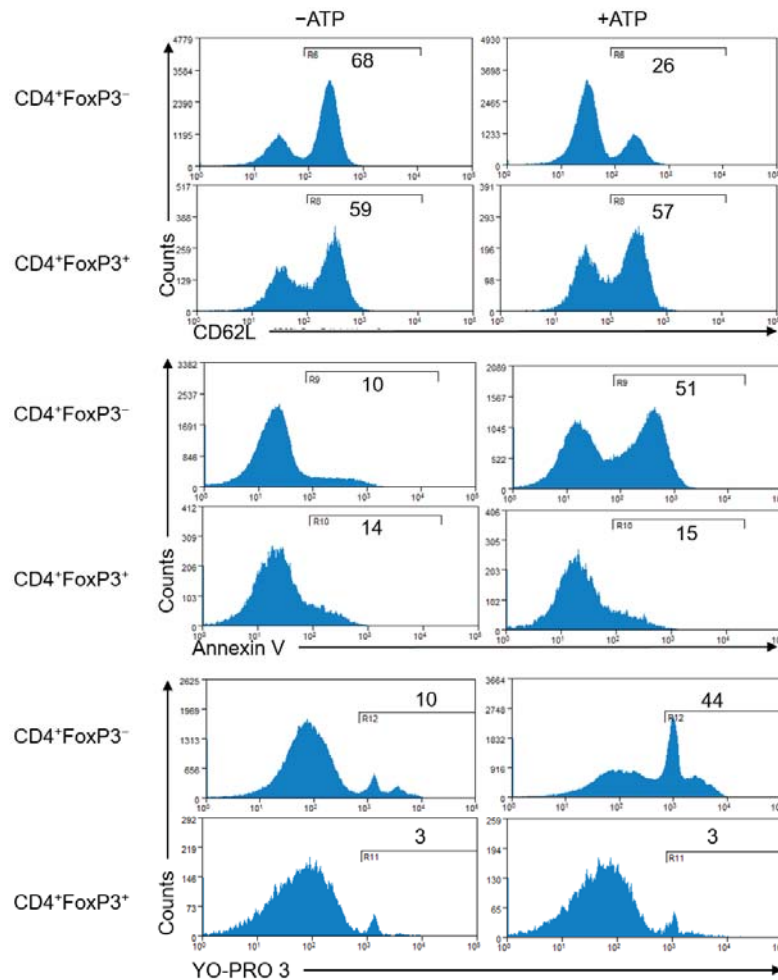


Figure 45 : Perte des fonctions cellulaires dépendantes de P2X7R dans les lymphocytes Treg des souris B6-P2X7O^{Foxp3-Cre}

Les nombres dans les histogrammes indiquent les pourcentages de cellules CD62L⁺, annexine V⁺ ou YO-PRO-3⁺ après traitement par 500 μM d'ATP dans les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels ou régulateurs Foxp3⁺.

De façon intéressante, les souris B6-P2X7O^{CreFoxp3} présentent un nombre deux fois plus important de lymphocytes Treg mais pas Tconv que les souris contrôles B6^{Foxp3-Cre} (Figure 46). P2X7R pourrait donc être impliqué dans la différenciation et/ou la survie des lymphocytes Treg. Des expériences sont en cours pour identifier plus précisément le rôle de P2X7R dans le développement et la survie des lymphocytes nTreg et

iTreg. De même il est important d'étudier si l'absence de P2X7R affecte les fonctions immuno-régulatrices des lymphocytes nTreg et/ou iTreg (production d'IL-10, de TGF- β et d'IL-35, expression de CTLA-4, production d'adénosine extracellulaire...).

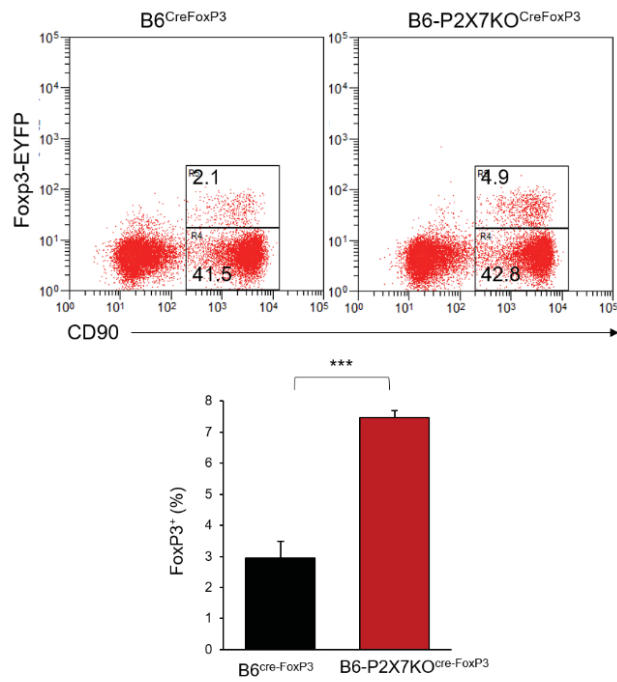


Figure 46 : Proportion des lymphocytes Treg dans la rate des souris B6^{FoxP3} et B6-P2X7KO^{FoxP3}

Discussion et Perspectives

Malgré le rôle reconnu de la voie ATP/P2X7R dans l'activation, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire des lymphocytes T ^{279,295,300,302}, son importance dans la réponse immunitaire adaptative reste assez peu connue voire controversé. Afin de mieux la définir, nous avons étudié (pages 79 ⁷ et 97) les taux en récepteurs P2X7 exprimés par les lymphocytes T, à leurs différents stades d'activation et de différenciation, ainsi que l'ensemble des fonctions cellulaires induites par la voie ATP/P2X7R à savoir : l'ouverture de canaux cationiques et formation de pores non sélectifs, l'externalisation des PS, l'activation des métalloprotéases ADAM et l'induction d'apoptose. Ces études nous ont permis de montrer que les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ présentent, selon leur stade d'activation, des taux d'expression membranaires variables en P2X7R ainsi que des réponses cellulaires à l'ATP distinctes. Nos études représentent la première description détaillée des taux d'expression du P2X7R à la surface des lymphocytes T et des fonctions cellulaires induites par la voie ATP/P2X7R. Dans les études précédentes, les chercheurs avaient quantifié les taux d'expression en P2X7R des lymphocytes T par Western Blot sur des lysat totaux de cellules spléniques ⁴²⁴ ce qui ne leur permettait pas de distinguer entre les P2X7R intracellulaires et ceux adressés à la membrane ²⁹⁵. Des quantifications par RT-PCR ont également été réalisées mais le taux d'expression en ARNm ne reflète pas toujours le taux d'expression en protéines. Nous avons donc quantifié, par cytométrie en flux, les P2X7R présents à la surface des lymphocytes T CD4⁺ (conventionnels et régulateurs) et CD8⁺ à leurs différents stades de différenciation et d'activation. Notre étude visait également à évaluer, sur l'ensemble des fonctions cellulaires dépendantes de P2X7R, les résultats précédemment publiés qui ont mis en évidence des différences en taux d'ouverture des canaux cationiques et d'induction de mort cellulaire entre les lymphocytes Treg et Tconv qui seraient dues à une différence en taux d'expression de P2X7R ^{279,295,300} lui-même dépendant (de façon inversement proportionnel) du taux d'expression de la phosphatase de membrane CD45RB à la surface des lymphocytes T ^{300,302}. Cependant, nous montrons que les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ de phénotype naïf CD44^{low}CD45RB^{high}, qui présentent tous les deux des taux similairement faibles en récepteurs P2X7, sont capables d'induire très efficacement l'activation des métalloprotéases ainsi que, bien que de façon moins importante, les autres fonctions cellulaires : ouverture des canaux calcique, formation des pores non sélectifs, externalisation des PS et induction de la mort cellulaire (Safya *et al*, 2018 ⁷; Mellouk *et al*, 2018, soumis pour publication). Nous montrons également que les taux d'expression de P2X7R à la surface des lymphocytes T augmentent après leur activation. En effet, les lymphocytes T naïfs CD44^{low}CD45RB^{high} récemment activés CD69⁺ présentent des taux significativement

plus élevés en récepteurs P2X7R que les lymphocytes T naïfs CD69⁻. Cependant, et de façon inattendue, ils sont complètement réfractaires à l'activation des métalloprotéases responsable du clivage de CD62L mais pas aux autres fonction cellulaires (canaux cationiques, pores non sélectifs, externalisation des PS, mort cellulaire) ce qui montre une dissociation entre le taux d'expression de P2X7R, les types de fonctions induites par l'ATP et leurs amplitudes. De plus, nous montrons que les lymphocytes Treg présentent les mêmes taux très élevés d'expression en P2X7R que les lymphocytes Tconv CD4⁺ du même stade d'activation, effecteur/mémoire, de phénotype CD44^{high}CD45RB^{low}. Ces taux de P2X7R sont corrélés avec un niveau très élevé d'induction de l'ensembles des fonctions cellulaires dans les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs/mémoires des deux sous-populations Treg et Tconv⁷. Nous en concluons que l'expression membranaire et l'activité des P2X7R dépendent du stade d'activation des lymphocytes T CD4⁺ mais pas de leur différenciation en Tconv ou Treg. D'autre part, même s'ils présentent les mêmes taux élevés d'expression de CD45RB, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et effecteurs/mémoires, respectivement, de phénotype CD44^{low}CD45RB^{high} et CD44^{high}CD45RB^{high} présentent des disparités importantes dans les fonctions cellulaires induites par P2X7R (Mellouk *et al*, 2018, soumis pour publication). Ces résultats montrent que le taux d'expression en phosphatases CD45RB n'a pas un impact direct sur la voie ATP/P2X7R contrairement à ce qui a été suggéré dans l'étude d'Aswad *et al*³⁰⁰. Avant notre étude, les réponses cellulaires des lymphocytes T CD8⁺ à une stimulation par l'ATP ont été très peu étudiées et les résultats obtenus étaient contradictoires. Pour certaines études, les lymphocytes T CD8⁺ des organes lymphoïdes secondaires présentent très peu de P2X7R à leur surface et sont peu sensibles à l'ATP²⁹⁹ alors que pour d'autres les lymphocytes T CD8⁺ clivent les molécules CD62L après stimulation par l'ATP de façon aussi efficace que les lymphocytes T CD4⁺⁴²⁵. Dans l'étude présente (page 97), nous montrons, pour la première fois, que les lymphocytes T CD8⁺ au stade naïf CD44^{low}CD45RB^{high} présentent les mêmes taux d'expression de P2X7R à leur surface que les lymphocytes T CD4⁺ du même stade d'activation et induisent de façon efficace les mêmes fonctions cellulaires en présence d'ATP. Cependant, et contrairement aux lymphocytes T CD4⁺ effecteurs/mémoires majoritairement de phénotype CD44^{high}CD45RB^{low}, les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires CD44^{high}CD45RB^{high} expriment des taux de P2X7R similaires à ceux du stade naïf mais sont totalement réfractaires à la voie ATP/P2X7R. Ce qui confirme de nouveau la dissociation entre le taux d'expression membranaire en P2X7R et les fonctions induites par l'ATP. Bien que cela soit peu évoqué dans la littérature, nous avons observé que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ acquièrent des phénotypes différents au stade effecteur/mémoire. Le phénotype CD44^{high}CD45RB^{high} est presque exclusif des lymphocytes T CD8⁺ alors que le phénotype effecteur/mémoire CD44^{high}CD45RB^{low} est essentiellement présent dans les lymphocytes T CD4⁺. D'autre part, la nature du ligand de P2X7 utilisé dans

les études précédentes pourrait être à l'origine des divergences entre nos résultats et ceux obtenus dans les études précédentes. En effet, nous avons utilisé l'ATP, le ligand naturel de P2X7R, et non pas le Bz-ATP qui est très largement utilisé dans les autres études du fait de sa plus grande stabilité. Le Bz-ATP ($EC_{50} = 15 \mu M$) stimule de façon beaucoup plus efficace les récepteur P2X7 que l'ATP ($EC_{50} = 85 \mu M$) notamment pour la formation du pore non sélectif (30% plus importante qu'avec une stimulation par l'ATP ⁴²⁶) ce qui aurait pu masquer les différences de sensibilités au ligand naturel de P2X7R, l'ATP, dans les études précédentes ^{279,295,300,302}.

Concernant le rôle de P2X7R dans l'activation, la survie et la différenciation des lymphocytes T ^{279,295}, nos résultats (manuscrit Mellouk *et al*, 2018 ; page 97) suggèrent que P2X7R jouerait un rôle dans la prolifération et/ou la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs activés en réponse primaire à travers les influx calciques. Cet effet serait encore plus important dans les lymphocytes T CD4⁺ réactivés en réponse secondaires (Tconv et Treg) car P2X7R induit très rapidement et fortement la formation de pores non sélectifs permettant une entrée accrue de Ca²⁺ (pages 79⁷ et 97). À l'inverse, dans les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires en réponse secondaire, P2X7R ne semble pas avoir un rôle dans leur réactivation ne pouvant pas former les canaux cationiques et les pores non sélectifs. Nos résultats suggèrent également que dans les foyers inflammatoires, riches en ATP, les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, notamment Treg, seraient plus sensibles à la mort cellulaire induites par l'ATP que les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs favorisant ainsi une réponse cytotoxique.

Contrairement à ce qui est généralement affirmé, nous montrons que les fonctions cellulaires induites par P2X7R ne suivent pas une règle du tout ou rien. Par exemple, en comparant les activités cellulaires ainsi que les taux d'expression des lymphocytes T CD4⁺ naïfs récemment activés (CD69⁺) en réponse primaire (phénotype CD44^{low} CD45RB^{high}CCR7⁺) ou mémoires récemment activés (CD69⁺) en réponse secondaire (CD44^{high}CD45RB^{low}CCR7⁺ ou CCR7⁻), nous avons trouvé que les lymphocytes T CD69⁺ présentent des réductions significatives de leur capacité à cliver CD62L en présence d'ATP malgré une expression plus importante de P2X7R à la surface comparée aux lymphocytes T CD69⁻. De même, les lymphocytes Tconv naïfs CD4⁺ de phénotype CD44^{low}CD45RB^{high}CD62L⁺ ont une capacité plus importante à cliver les molécules de *homing* CD62L en présence d'ATP que les lymphocytes T mémoires de phénotype CM CD4⁺ CD44^{high}CD62L⁺CCR7⁺⁷ suggérant que P2X7R n'aurait pas un rôle central dans le clivage de molécules de *homing* CD62L des lymphocytes T mémoires du moins au stade CM. Les molécules CD62L facilitent l'entrée des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires et les récepteurs S1P1 leur sortie (paragraphe .II, page 23). Les molécules CD69 exprimées par les lymphocytes T récemment activés

entraînent l'internalisation et la dégradation des récepteurs S1P1 de leur surface ⁴²⁷ les maintenant dans les ganglions lymphatiques jusqu'à la fin de la phase de prolifération et différenciation. Le clivage de CD62L empêche également le retour des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques ce qui favorise le déplacement des lymphocytes T effecteurs aux foyers inflammatoires ⁴²⁸. La capacité réduite des lymphocytes T CD69⁺ à cliver les molécules CD62L suite à une activation autocrine de P2X7R pourrait amplifier l'effet de rétention des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires induit par l'inhibition des récepteurs S1P1. Inversement, une capacité plus importante des cellules CD69⁺ à ouvrir les canaux calciques et former les pores non sélectifs pourrait favoriser l'activation et la prolifération des lymphocytes T récemment activés grâce aux apports calciques responsables de l'activation de certains facteurs de transcriptions tel que NFAT. Bien qu'il a été publié que le Ca²⁺ extracellulaire n'est pas impliqué dans la formation des pores P2X7R ⁴²⁹, nous avons montré que cette fonction ainsi que l'externalisation des PS, mais pas le clivage de CD62L, sont fortement affectées en cas de déplétion du Ca²⁺ extracellulaire ⁷ et, à l'inverse, amplifiées par l'augmentations de sa concentration dans le milieu (Mellouk *et al* ; pages : 97). Ces résultats sont en accord avec une précédente étude montrant que le clivage des protéines β -amyloïdes par la voie ATP/P2X7R dans les neurones ne dépendait pas du Ca²⁺ extracellulaire ²⁷⁵. En conclusion, l'ensemble de nos résultats renforcent les études précédentes ^{279,295,300} sur l'implication des P2X7R dans les premières étapes d'activation des lymphocytes T.

La dissociation fonctionnelle de la voie ATP/P2X7R pourrait être due à l'expression dans les lymphocytes T d'une isoforme particulière de P2X7R ^{266,284,430}. Cependant, nos analyses par RT-PCR et Immunoprécipitation n'ont pas permis de mettre en évidence l'expression de différentes isoformes de P2X7R dans les sous-populations lymphocytaires T quel que soit le stade d'activation (résultats non montrés). Les ecto-ATPases, CD39 et CD73, ne semblent pas être non plus responsables de la faible sensibilité à l'ATP de certaines sous-populations de lymphocytes T car elles sont exprimées à des taux élevés aux stades d'activation où nous observons les plus fortes activités cellulaires induites par la voie ATP/P2X7R comme dans les lymphocytes Treg et Tconv au stade effecteur/mémoire CD44^{high}CD45RB^{low}.

Dans la lignée de souris auto-immunes MRL/lpr, notre équipe a montré que les lymphocytes T DN B220⁺ responsables de la lymphoaccumulation sont résistants à toute stimulation par l'ATP suite à la perte d'expression membranaire de P2X7R ³³⁰. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette perte d'expression de P2X7R pourrait contribuer, en synergie avec le récepteur d'apoptose Fas, à la lymphoaccumulation et que par voie de conséquence P2X7R serait impliqué dans l'homéostasie des lymphocytes T. Pour tester notre hypothèse, nous avons généré dans le fond génétique B6 une lignée de souris exprimant la mutation

lpr du gène *fas* et présentant une inactivation complète du récepteur P2X7 (P2X7KO). Cette lignée de souris dénommée B6/*lpr*-P2X7KO présente au cours du vieillissement un syndrome lymphoprolifératif et auto-immun, suggérant que l'absence de P2X7R au niveau des lymphocytes T amplifie drastiquement les syndromes des souris B6/*lpr*. Il est à noter que la mutation *lpr*, dans le fond génétique B6, n'induit qu'un faible syndrome auto-immun et très peu de lymphoaccumulation démontrant que d'autres gènes importants pour la pathologie sont présents dans le fond génétique MRL³⁰⁹. Notre hypothèse est, au moins en partie, vérifiée par le fait que les souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent des adénopathies et des splénomégalies qui sont, comme dans le modèle MRL/*lpr*, dues à l'accumulation de lymphocytes T de phénotype DN B220⁺. Ces lymphocytes T pathogéniques dérivent probablement de la sous-population CD8⁺ car ils présentent un phénotype effecteur/mémoire de type CD44^{high}CD45RB^{high} et expriment des taux élevés en facteurs de transcription Eomes caractéristiques des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires (manuscrit Mellouk *et al* ; page : 132). Notre hypothèse sur l'origine CD8 des lymphocytes T DN B220⁺ est renforcée par l'étude de Kinjyo *et al*³²⁰ qui montre qu'une déficience en facteur de transcription Eomes protège les souris *lpr* du développement des adénopathies causées par l'accumulation de lymphocytes T DN B220⁺ ainsi que par nos observations que les lymphocytes T CD8⁺ CD44^{high}CD45RB^{high} sont totalement réfractaires à la voie ATP/P2X7R (Mellouk *et al* ; page : 97). Enfin, nous avons observé, au cours du vieillissement et donc du développement de la lymphoaccumulation T DN B220⁺, une diminution progressive de l'expression du corécepteur CD8 à la surface des lymphocytes T des souris B6/*lpr*-P2X7KO. L'ensemble de ces résultats suggère que la population de lymphocytes T DN B220⁺ pathogéniques est majoritairement issues des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs/mémoires.

Chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO, comme chez les souris MRL/*lpr*, on observe que les populations de lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ de phénotype naïf CD44^{low}CD45RB^{high}CD62L⁺CCR7⁺ acquièrent au cours du vieillissement, et dans des conditions d'animalerie EOPS, un phénotype majoritairement effecteur/mémoire CD44^{high}CD45RB^{high} ou ^{low} pouvant atteindre un stade très avancé de différenciation semblable à celui des lymphocytes T EMRA CD44^{high}CD45RB^{high}CD62L⁻CCR7⁻^{180,181} ou celui des lymphocytes T CD8⁺ *exhausted* CD44^{high}CCR7⁻PD-1⁺TIM3⁺. Cette forte activation des lymphocytes T rappelle celle retrouvée lors d'une activation antigénique chronique. Étant donné le fort état d'activation des lymphocytes T des souris B6/*lpr*-P2X7KO, nous avons étudié la capacité de ces souris à monter une réponse immunitaire cellulaire et humorale contre des vecteurs adénoviraux exprimant l'ovalbumine au niveau de la capsid. Les résultats obtenus montrent que les lymphocytes T DN B220⁺ ne sont pas activables du moins par une infection de courte durée (deux semaines). Cela peut être dû à une fréquence inhabituellement faible de lymphocytes T

spécifiques des peptides dérivés du vecteur adénoviral et de l'ovalbumine du fait de l'accumulation massive de lymphocytes T activés de spécificités variées et/ou à leur stade de différenciation trop avancé voire sénescence. De même, la réponse cellulaire des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ est beaucoup moins importante dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO que dans les souris contrôles B6, B6-P2X7KO et B6/*lpr*. De plus, nous avons observé des titres en anticorps anti-adénovirus et anti-ovalbumine très faibles accompagnés de proportions réduites en lymphocytes T CD4⁺ activés exprimant le facteur de transcription T-bet ou ROR γ t. La diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire peut être due à la non capacité des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ à s'activer ou à un défaut de présentation antigénique d'origine indéterminée pouvant être liée à l'absence simultanée des deux récepteurs P2X7R et Fas. De façon intéressante, lors d'infections de plus longue durée (3 mois, résultats non présentés), nous avons observé une augmentation continue des taux d'anticorps spécifiques des adénovirus chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO pouvant atteindre ceux présents chez les souris B6 ou B6-P2X7KO mais avec une cinétique décalée. Ce résultat suggère que dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO la réponse aux antigènes se met en place plus lentement mais persiste plus longtemps. Nous avons d'autre part observé un fort taux de mortalité chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO mais pas les souris contrôles peu de temps après la charge virale. Cette mortalité ne peut pas être liée à l'adénovirus lui-même puisqu'il est inactivé mais pourrait être la conséquence d'une surcharge cytokinique étant donné le très fort contexte inflammatoire existant chez ces souris au moment de l'injection des vecteurs adénoviraux. L'étude des réponses immunitaires anti-ovalbumine a montré également que la simple ou la double déficience en P2X7R et/ou en Fas n'affecte pas l'orientation des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs vers les phénotypes SLEC, MPEC ou en DPEC et donc le devenir de ces cellules en lymphocytes T CM, EM ou RM.

Cet état d'activation chronique des lymphocytes T des souris B6/*lpr*-P2X7KO est également responsable d'une forte dérégulation de la production de cytokines et de chimiokines ainsi que de taux sériques très élevés en auto-anticorps anti-ADNdb et en facteurs rhumatoïdes essentiellement de sous-classes fixant le complément (IgG2a). Cependant, malgré un contexte très inflammatoire, les souris B6/*lpr*-P2X7KO ne présentent pas les lésions cutanées de type lupique ou causées par des vascularites caractéristiques des souris MRL/*lpr* suggérant que d'autres gènes présents dans le fond génétique MRL sont impliqués dans ses atteintes tissulaires. En accord avec ces résultats, seules les souris MRL/*lpr* présentent des taux élevés de CRP (Protéine C réactive) qui sont révélatrices de lésions tissulaires. D'autre part, les souris B6-*lpr*-P2X7KO possèdent un nombre très important de lymphocytes Treg, aussi bien en pourcentage qu'en nombre absolu, dans les organes lymphoïdes secondaires qui est la conséquence la plus probable de leur absence d'expression de P2X7R puisque nous avons mis en évidence leur très forte sensibilité à la mort

cellulaire induite par la voie ATP/P2X7R chez les souris B6 normales⁷. De plus, les sérums des souris B6-*lpr*/P2X7KO présentent des taux importants de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 sécrétée par les lymphocytes Treg³⁸⁷ mais qui est, dans le cas du lupus, un amplificateur de la pathologie en participant à la production des autoanticorps³⁸⁹. Ces caractéristiques propres au modèle B6/*lpr*-P2X7KO pourraient expliquer la faible voire l'absence de destructions tissulaires malgré la lymphoaccumulation et la présence de nombreux infiltrats lymphocytaires dans des tissus comme le foie (manuscrit Mellouk *et al* ; page : 132).

L'importance des lymphoaccumulations présentes dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO suggèrent que le récepteur P2X7 contribue, en synergie avec le récepteur Fas, au maintien de l'homéostasie des lymphocytes T, en particulier, de la sous-population CD8⁺. En effet, en plus de leur résistance à la voie ATP/P2X7R, il a été suggéré que les lymphocytes T CD8⁺ sont moins sensibles que les lymphocytes T CD4⁺ à la mort cellulaire induite par la voie Fas/FasL⁴²¹ que nous avons confirmé en comparant le taux d'apoptose induit dans les lymphocytes T effecteurs/mémoires CD4⁺ et CD8⁺ par un anticorps agoniste du récepteur Fas (Figure 32 et Figure 33). De plus, au stade préapoptotique B220⁺, les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ sont totalement réfractaires à la voie ATP/P2X7R³³⁰. Cet effet pourrait-être amplifié dans les lymphocytes T DN B220⁺ à cause de leur taux membranaire très élevé en ecto-ATPases CD73 (Figure 36). Les lymphocytes T DN B220⁺ pathogéniques des souris lupiques MRL/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO présentent des taux élevés en marqueur d'activation CD69 à leur surface (Mellouk *et al*, page : 132 et résultats non présentés) ce qui, comme dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ récemment activés CD69⁺ des souris contrôles B6, pourrait affecter l'activation des métalloprotéases responsables du clivage de la molécule de *homing* CD62L⁷.

Nous avons également cherché à déterminer si les deux voies ATP/P2X7R et Fas/FasL pouvaient interagir entre elles. La seule déficience en P2X7R n'affecte pas le taux d'expression en récepteur Fas à la surface des lymphocytes T des souris (Figure 34) ni sa capacité à induire l'apoptose (Figure 33). De façon étonnante, les lymphocytes T des souris lupiques MRL/*lpr* et B6/*lpr*-P2X7KO, ainsi que ceux des souris B6-P2X7KO âgées de 6 mois mais pas de 2 mois (Figure 35), présentent des taux faibles en molécules cFlip ce qui suggère que P2X7R pourrait être impliqué dans le contrôle de l'expression de cFlip. De plus, P2X7R peut activer certains facteurs de transcriptions tels que Foxo1, NF-κB et NFAT impliqués dans l'expression de cFlip^{292,431,432}. En conclusion, il semble bien que la voie ATP/P2X7R puisse réguler l'intensité de la mort cellulaire induite par Fas en agissant sur les constituant du DISC. Afin d'élucider les mécanismes de transduction du signal partagés entre le voies Fas/FasL et ATP/P2X7R, nous avons sélectionné parmi un panel de lignées lymphocytaires T humaine et murine celles ayant la capacité ou non d'exprimer et d'activer les récepteurs Fas et P2X7. Comme dans nos expériences *ex vivo* sur les lymphocytes T, nos résultats

montrent que le taux et le type des fonctions induites par l'ATP ne dépendent pas des taux d'expression de P2X7R à la surface des lignées cellulaires. Ainsi, les cellules murines EL4, BW5147 et L1210, bien qu'elles présentent toutes des taux importants de P2X7R à leur surface (Figure 37), répondent de façons différentes à une stimulation par l'ATP. Les cellules EL4 peuvent efficacement ouvrir les canaux cationiques (Figure 38), externaliser les PS et former les pores non sélectifs (Figure 39) alors que les cellules L1210 qui présentent des taux très élevés en P2X7R (Figure 37) ne sont pas capables d'exprimer ces fonctions cellulaires en réponse à l'ATP (Figure 38 et Figure 39). Les cellules de la lignée BW5147, qui présentent des taux intermédiaires de P2X7R (Figure 37), ont la capacité d'ouvrir les canaux cationiques (Figure 38) et d'externaliser les PS mais pas celle de former les pores non sélectifs (Figure 39). Comme attendu, les lignées qui n'expriment pas P2X7R (Figure 37), comme les lignées humaines Jurkat et HPB-ALL, sont réfractaires à l'ensemble de ces fonctions (Figure 38, Figure 39 et résultats non présentés). Nous avons postulé que les différences observées dans les fonctions cellulaires induites par l'ATP malgré la présence de taux équivalents de P2X7R à la surface seraient dues à l'expression d'isoformes particulières du récepteur¹². Nous avons vérifié si ces lignées exprimaient différentes isoformes P2X7R (a ou k chez la souris) ou des formes tronquées de la protéine par immunoprécipitation des récepteurs (résultats non présentés) et amplification des ARNm par RT-PCR suivie de séquençage (Figure 40 et résultats non présentés). Le séquençage des ADNc codant pour P2X7R ne montre pas de délétions, de mutations, ou d'épissages alternatifs différents de ceux de l'isoforme a ou k. L'ensemble de ces résultats montrent que les différences observées dans les fonctions induites par l'ATP sont dues à d'autres paramètres ou acteurs moléculaires. Des expériences *in vitro* sont actuellement en cours afin de mieux comprendre ces différences. En particulier, nous évaluons l'implication du cholestérol membranaire²⁷³ dans la fonctionnalité des P2X7R des lignées cellulaires après la réduction de sa proportion dans les membranes à l'aide de la méthyle- β -cyclodextrine. Notre hypothèse est que la présence de P2X7R dans les radeaux lipidiques inhibe sa fonction. L'utilisation des lignées cellulaires dans l'étude des interactions entre les voies ATP/P2X7R et Fas/FasL nécessitera au préalable leur transfection pour qu'elles expriment des taux équivalents en récepteurs Fas membranaires afin d'évaluer l'impact de chaque fonction induite par l'ATP sur le recrutement du complexe DISC (Fas, FADD, cFlip et Caspase 8) et l'induction d'apoptose. Pour ce qui est de l'étude des voies de signalisations, en plus de la phosphorylation de Erk1/2 (Figure 41), nous étudions l'activation d'autres acteurs cellulaires de la voie ATP/P2X7 tels que la MAP kinase p38 impliquée dans l'apoptose de certains neurones de façon dépendante de P2X7R⁴³³, la voie PI3K/Akt impliquée dans l'adressage et la localisation membranaire de Fas⁴³⁴ ainsi que dans l'expression de cFLIP ou encore la MAP kinase JNK dont l'activation peut être modulée par la voie ATP/P2X7R²⁷⁸. Actuellement, nous étudions

également, *in vivo* et *in vitro*, l'impact de la voie ATP/P2X7R sur l'activation des facteurs de transcriptions Foxo1, NF- κ B, AP-1 et NFAT impliqués dans l'expression de cFLIP^{431,432}. Nous souhaitons également identifier par co-immunoprécipitations suivies de spectrométrie de masse les éventuels acteurs protéiques, encore inconnus, impliqués dans la synergie entre les récepteurs Fas et P2X7.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du développement des maladies auto-immunes de type lupique nous avons étudié les transcriptomes des organes lymphoïdes secondaires des souris lupiques MRL/*lpr* avant (âgées de 2 mois) et après (âgées de 5 mois) le développement de la maladie. Ces transcriptomes ont été comparés à ceux de souris B6/*lpr*-P2X7KO saines (âgées de 4 mois) et malades (≥ 6 mois) ainsi qu'à ceux de souris B6 normales ou B6 mutées uniquement pour Fas (*lpr*) ou P2X7R (P2X7KO). Les analyses RNAseq ont permis d'identifier 387 gènes exprimés différemment (résultats non présentés) parmi lesquels nous avons sélectionné 33 gènes impliqués dans l'activation, la différenciation et le trafic des cellules immunitaires ainsi que l'apoptose ou encore la phagocytose (Tableau 7). L'expression différentielle de ces 33 gènes a ensuite été confirmée par des analyses de RT-PCR quantitatives sur 6 souris individuelles par lignée y compris la lignée B6/*lpr* dont l'analyse bio-informatique du transcriptome des organes lymphoïdes secondaires n'a pas encore été réalisée. L'analyse bio-informatique de l'expression différentielle de ces gènes par le logiciel GENE-E Morpheus a permis de regrouper les souris en 3 catégories (Figure 42) : **1**) celle des souris saines (partie droite du *heatmap*) rassemblant uniquement des souris B6 ou B6-P2X7KO ; **2**) celle des souris légèrement atteintes (milieu du *heatmap*) qui comporte principalement les souris B6/*lpr*, B6/*lpr*-P2X7KO âgées de 4 mois et MRL/*lpr* de 2 mois **3**) celle des souris sévèrement atteintes (à gauche du *heatmap*) qui est constituée principalement de souris MRL/*lpr* âgées de 4 mois et B6/*lpr*-P2X7KO âgées de 6 mois. Cette étude de transcriptome renforce la proximité de notre modèle B6/*lpr*-P2X7KO avec le modèle MRL/*lpr* et donc l'impact de P2X7R dans la sévérité de la maladie. D'autre part, cette étude bio-informatique a permis également de classer les gènes exprimés différemment en 4 groupes : **a**) celui des gènes présents dans les souris saines et surexprimés par les souris atteintes (haut du *heatmap*) et impliqués dans l'apoptose, l'élimination des corps apoptotiques ainsi que la migration et l'activation des cellules immunitaires ; **b**) celui des gènes présents dans les souris saines et sous-exprimés par les souris atteintes (milieu du *heatmap*) et qui comprend des récepteurs aux anticorps et aux compléments, des facteurs de transcription et d'activation des cellules immunitaires ; **c**) celui des gènes surexprimés par les souris atteintes et absents des souris saines et qui codent pour des protéines antiapoptotiques et des molécules de costimulation ; enfin **d**) celui des gènes surexprimés par les souris peu atteintes (bas du *heatmap*) et qui comporte des cytokines proinflammatoires et des protéines de

transduction de signal. L'ensemble de ces résultats confirme la complexité des mécanismes physiopathologiques contribuant à l'auto-immunité et nous ouvre la possibilité de découvrir d'autres acteurs de la réponse immunitaire, en particulier, ceux impliqués dans l'homéostasie des lymphocytes T et qui peuvent potentiellement jouer un rôle important dans le développement des maladies auto-immunes de type lupique.

Articles en annexe

.I Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface

Mohcine Benbijja, Amine Mellouk et Pierre Bobé

Moléculair Cancer, 2014

.I.1 Résumé

Il a été montré dans le laboratoire que le trioxyde d'arsenic, As_2O_3 , est un nouvel agent thérapeutique des maladies auto-immunes. Ce travail a permis la mise en place d'un essai clinique de phase IIa. L'étude du mécanisme d'action de l' As_2O_3 est difficile chez les souris MRL/lpr du fait de l'impossibilité d'étudier ex vivo les lymphocytes T pathogénique DN B220⁺. En effet, alors que ces lymphocytes T sont résistants à l'apoptose *in vivo*, ils entrent spontanément en apoptose ex vivo. En conséquence, nous avons sélectionné, parmi un grand panel de lignées lymphocytaires T, sept lignées humaines et murines (Jurkat, Jurkat variant J45.01, HPB-ALL, EL4, BW5147 et L1210) pour leurs très grandes différences de sensibilités à l' As_2O_3 *in vitro*. La lignée NB4 issue d'un patient atteint de leucémie aigüe promyélocytaire a servi comme contrôle de grande sensibilité à l' As_2O_3 . Ce travail nous a permis de montrer que la sensibilité à l' As_2O_3 des lymphocytes T est dépendante de leur capacité à induire rapidement une forte expression de la phosphatase de membrane B220 à leur surface. Cette sensibilité à l' As_2O_3 est également corrélée avec le taux d'expression d'HSP70 membranaire et de caspases activées. À très faibles doses, le traitement des lignées à l' As_2O_3 augmente la translocation de NF- κ B (p50) dans les noyaux. Cet effet est inversé à forte doses d' As_2O_3 . Dans les lignées sensibles à l' As_2O_3 qui expriment les molécules B220 à la membrane à de faibles doses d' As_2O_3 , la mort cellulaire est induite uniquement par apoptose alors que, dans les lignées cellulaires qui requièrent de fortes doses d' As_2O_3 pour exprimer les molécules B220, la mort cellulaire est induite par apoptose et nécrose.

RESEARCH

Open Access

Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface

Mohcine Benbijja^{1,2}, Amine Mellouk³ and Pierre Bobé^{1,3*}

Abstract

Background: Arsenic trioxide (As_2O_3) is highly effective in treating acute promyelocytic leukemia (APL), but shows more variable therapeutic efficacy for other types of hematological malignancies. Previously, we reported that As_2O_3 selectively eliminates pathogenic B220-expressing T cells in autoimmune MRL/*lpr* mice. We investigated herein the relationship between As_2O_3 sensitivity of leukemic T-cell lines and the expression levels of the B220 isoform of transmembrane tyrosine phosphatase CD45.

Methods: GSH content, O_2^- production, and B220, HSP70, Fas and FasL membrane expression was measured by flow cytometry. Subcellular localization of B220 was determined by imaging flow cytometry. Cell death was analyzed by morphological changes, annexin V and propidium iodide staining, and caspase 8 and 9 activation. B220 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. Activated NF- κ B p50 was quantified by a DNA binding ELISA.

Results: We selected human (Jurkat, Jurkat variant J45.01, HPB-ALL) and mouse (EL-4, BW5147, L1210) T-cell lines for their marked differences in As_2O_3 sensitivity over a large range of doses (1 to 20 μ M). Differences in redox status cannot explain the dramatic differences in As_2O_3 sensitivity observed among the T-cell lines. Unexpectedly, we found that B220 is differentially induced on As_2O_3 -treated T-cell lines. As_2O_3 treatment for 24 h induced low (HPB-ALL), intermediate (Jurkat) and high (EL-4, BW5147) levels of B220 membrane expression, membrane-bound HSP70 and cell death, but inhibited NF- κ B p50 nuclear translocation. When high levels of B220 expression were achieved with low doses of As_2O_3 , the T-cell lines died by apoptosis only. When high doses of As_2O_3 were required to induce B220 expression, leukemic T cells died by both apoptosis and necrosis.

Conclusions: Cellular redox status is not essential for As_2O_3 sensitivity of leukemic T cells, suggesting the existence of additional factors determining their sensitivity to As_2O_3 cytotoxicity. Phosphatase B220 could be such a factor of sensitivity. As_2O_3 treatment inhibits NF- κ B p50 nuclear translocation, and induces B220 expression and cell death in a dose and time dependent manner. The levels of B220 induction on leukemic T cells strictly correlate with both the extent and form of cell death, B220 might therefore play a checkpoint role in death pathways.

Keywords: As_2O_3 -based therapy, Leukemia, T lymphocyte, Membrane tyrosine-phosphatase B220/CD45R, Membrane-bound HSP70, Fas/Fas ligand pathway, Cell death, Caspase activation, NF- κ B p50

* Correspondence: pierre.bobe@u-psud.fr

¹Institut Jacques Monod, CNRS, Université Paris Diderot, Paris, France

³INSERM U757, Université Paris-Sud, Orsay, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Arsenic trioxide (As_2O_3) shows impressive efficacy in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia (APL) [1-4]. As_2O_3 induces clinical remission in APL patients by multiple mechanisms [5]. As_2O_3 promotes cell differentiation at low concentrations [6,7], whereas it induces apoptosis at higher concentrations [8]. The high sensitivity of the APL cell line NB4 to As_2O_3 -induced cytotoxicity is associated to its low content of reduced glutathione (GSH) and increased production of reactive oxygen species (ROS) [9-11]. Although most studies have been focused on the APL, As_2O_3 could be beneficial against various hematopoietic malignancies and solid tumors [12]. Moreover, we have shown that As_2O_3 also possesses immunomodulatory properties, and might be a therapeutic agent for autoimmune diseases. Indeed, As_2O_3 selectively eliminates the pathogenic B220-expressing double negative (DN) $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ T cells that accumulate in autoimmune MRL/*lpr* mice due to the *lpr* mutation of the death receptor Fas [13,14].

In normal murine and human T cells, CD4^+ and CD8^+ effector T cells massively induce the expression of transmembrane tyrosine phosphatase B220 before undergoing apoptosis by the Fas/Fas ligand (FasL) pathway [15,16]. In Fas-deficient mice and patients, CD4^+ and CD8^+ effector T cells also express the B220 molecules at their surface, but then they downregulate their CD4 or CD8 molecules while maintaining B220 plasma membrane expression. B220 (or CD45RABC) is one of the five isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 found on lymphocytes. CD45 isoforms are generated by cell-type and activation-state specific alternative splicing of exons 4/A, 5/B, and 6/C encoding domains at the NH_2 -terminus. Naive T cells express high molecular weight CD45 isoforms (CD45RA or CD45RB) containing the A domain in humans or the B domain in mice whereas effector/memory T cells expressed the low molecular weight isoform CD45RO lacking extracellular domains A, B and C. All CD45 isoforms share the same intracellular region, which contains two phosphatase domains. Although the function of each isoform remains unknown, it is well established that CD45 phosphatase activity is crucial for lymphocyte development, and antigen and cytokine receptor signaling [17-19]. CD45 might also regulate apoptosis of T and B lymphocytes [20-22].

In this study, we found that murine (EL-4, BW5147, L1210) and human (Jurkat, CD45-deficient Jurkat variant, HPB-ALL) leukemic T-cell lines dramatically differed in their sensitivity to As_2O_3 -induced cell death. In contrast with previous findings in APL cell line NB4 [9,10], these differences in As_2O_3 sensitivity are independent of intracellular GSH content and O_2^- production. Unexpectedly, we found that As_2O_3 differently induced B220 cell surface expression in the leukemic

T-cell lines in a dose- and time-dependent manner. Moreover, the levels of B220 expression correlated with the sensitivity of these T-cell lines to As_2O_3 . Induction of B220 membrane expression by As_2O_3 treatment is reminiscent of that observed on antigen-activated normal T-cell blasts before undergoing apoptosis [15,16]. Therefore, the leukemic T-cell lines were activated with calcium ionophore A23187, which triggers both cell activation and cell death. Calcium ionophore A23187 also induced B220 expression and cell death, but with reverse efficiencies in the leukemic T-cell lines compared to As_2O_3 . In addition, T-cell lines treated with A23187 most probably died by an activation-induced cell death mechanism since the T-cell activation marker CD69 is expressed before B220 expression and cell death. In contrast, CD69 was not detected on As_2O_3 -treated cells, indicating that B220 expression occurs independently of leukemic T-cell activation. Surprisingly, we found that B220 is expressed constitutively on L1210 T cells. L1210 cells were highly sensitive to A23187 treatment whereas they were highly resistant to As_2O_3 cytotoxicity, indicating that the constitutive high-level expression of B220 did not favor cell death triggered by As_2O_3 . B220 induction on the T-cell lines after treatment with As_2O_3 or calcium ionophore A23187 strictly correlates with sensitivity to cell death, emphasizing the role of B220 as a proapoptotic factor. However, our data indicate that As_2O_3 and A23187 trigger B220 induction and cell death through different upstream signaling pathways. Different signaling pathways, such as the c-Jun NH_2 -terminal kinase, have been implicated as mediators of the cytotoxic effects of As_2O_3 in the APL cell line NB4 [23]. Here, we show that high induction of B220 expression on leukemic T cells is a determining factor leading to As_2O_3 -triggered cell death. Thus we hypothesize that B220 might play a checkpoint role in death pathways.

Results

Human and mouse leukemic T-cell lines exhibit different sensitivities to As_2O_3 -induced growth inhibition and cytotoxicity

In addition to APL-derived NB4 cells, As_2O_3 kills various cancer cell types [12]. However, As_2O_3 sensitivity varies considerably among tumor cell lines. In the present study, we determined the sensitivity to As_2O_3 -induced cytotoxicity and growth inhibition of human (Jurkat and HPB-ALL) and murine (EL-4, BW5147 and L1210) leukemic T-cell lines. The five T-cell lines along with APL-derived NB-4, known for its high sensitivity to As_2O_3 cytotoxicity, were treated with As_2O_3 in doses ranging from 1 to 20 μM for 12, 24 and 48 h. Then, the percentage of living cells was determined by Annexin V and propidium iodide (PI) staining, and flow cytometry. We rapidly abandoned treatments for 12 h and 48 h. Indeed, 100% EL-4 and

BW5147 cells were killed after 24 h of treatment with low doses of As_2O_3 , whereas HPB-ALL and L1210 cells showed no sensitivity to As_2O_3 cytotoxicity before 24 h of treatment, even with high doses (data not shown). Because 24 h of treatment was the optimal time to observe significant differences in As_2O_3 cytotoxicity among T-cell lines, this duration was used in subsequent experiments. Sensitivity to As_2O_3 varied considerably among the T-cell lines (Figure 1A). While around 3% NB4, 6% EL-4 and 13% BW5147 cells remained alive (Annexin V⁻ and PI⁻) at a concentration of 4 μM As_2O_3 , remarkably, the percentages of living cells were around 65% for Jurkat cells, and between 80% and 90% for HPB-ALL and L1210 cells (Figure 1A). In addition, even at a dose of 20 μM , 20% L1210 and 40% HPB-ALL cells remained Annexin V⁻ and PI⁻ (Figure 1A). The marked differences in As_2O_3 sensitivity among the T-cell lines can also be shown by calculating the concentration of As_2O_3 that killed 50% of the cells (IC_{50} value). The IC_{50} value of As_2O_3 was 1.5 μM for EL-4, 2.5 μM for BW5147, 6 μM for Jurkat, 13 μM for L1210 and 15 μM for HPB-ALL cells compared with 1.5 μM for the highly sensitive APL-derived NB4 cells (Figure 1A). As_2O_3 cytotoxicity was also evaluated through flow cytometric analysis of physical characteristics of As_2O_3 -treated T-cell lines using forward (FSC) and side (SSC) scatters since dying or dead cells have lower FSC and higher SSC than living cells. Depending upon the dose of As_2O_3 , two populations were observed on the dot plots for FSC vs. SSC. The one containing large cells (region R2) encompassed live cells, and the other containing smaller cells (region R1) encompassed dying/dead cells (Additional file 1: Figure S1A). We observed that 50% of the cells of region R2 shifted to region R1 at 2.5 to 3 μM As_2O_3 for BW5147 and EL-4 cells, 6 μM for Jurkat cells, and 15 μM for L1210 and HPB-ALL cells compared with 1.5 μM for the APL cell line NB4 (Figure 1B). In parallel, we determined As_2O_3 -induced cell growth inhibition by counting the total cell number in each condition using flow cytometry. IC_{50} value for growth inhibition was around 1 μM for NB4 and EL-4 cells, 3.5 μM for BW5147 cells, 8 μM for Jurkat, 15 μM for L1210 and HPB-ALL cells. In summary, EL-4 and BW5147 cells, and to a lesser extent Jurkat cells, are among the most sensitive T-cell lines to As_2O_3 -induced cell growth inhibition and cytotoxicity, whereas L1210 and HPB-ALL cells are the most resistant.

Lack of evidence for the implication of GSH and O_2^- in As_2O_3 -induced cytotoxicity in T-cell lines

As_2O_3 is able to impair the function of the mitochondrial respiratory chain, leading to increased O_2^- production [24]. O_2^- is neutralized by intracellular GSH, which is the major antioxidant produced by the cell. The detoxification function of intracellular GSH also includes

the cellular efflux of As_2O_3 [25]. Therefore, we performed flow cytometry analysis of intracellular GSH content and O_2^- production in the T-cell lines before and after treatment with As_2O_3 (Figure 2). APL-derived NB4 cells were used as a reference because intracellular redox status has been shown to be important in APL sensitivity to As_2O_3 [9,10]. As observed in many cancer cells [25], the untreated cell lines showed considerable heterogeneity in the intrinsic levels of O_2^- production, with untreated NB4 cells displaying the lower level of O_2^- (Figure 2A). In As_2O_3 -treated APL-derived NB4 cells, O_2^- production increased with the dose of arsenic (Figure 2B). In As_2O_3 -sensitive EL-4 and BW5147 T-cell lines, O_2^- production was not increased by As_2O_3 treatment even at the high dose of 15 μM (Figure 2B). In contrast, in As_2O_3 -resistant Jurkat and L1210 T-cell lines, O_2^- production was markedly increased (Figure 2B). Therefore, these data indicate that the differences in As_2O_3 sensitivity between EL-4, BW5147, Jurkat and L1210 cells are not directly linked to increased production of O_2^- .

As expected, As_2O_3 -sensitive APL-derived NB4 cells displayed extremely low level of intrinsic GSH content (Figure 2A). In contrast, the intrinsic GSH content in untreated EL-4 and BW5147 T-cell lines were significantly higher than in untreated HPB-ALL and L1210 T-cell lines (Figure 2A), although L1210 and HPB-ALL cells were considerably more resistant to the cytotoxic effect of As_2O_3 than EL-4 and BW5147 cells. At the dose of 1 μM As_2O_3 , levels of GSH were unaffected by the treatment in the extremely sensitive NB4 cells, but were markedly decreased in As_2O_3 -sensitive BW5147 T cells and also, although to a lesser extent, in the As_2O_3 -resistant Jurkat cells (Figure 2B). Furthermore, in the extremely resistant L1210 T cells, GSH production was unchanged even at the high dose of 15 μM As_2O_3 (Figure 2B). Therefore, our data indicate that intracellular GSH content alone cannot account for the differences in As_2O_3 sensitivity observed among the five T-cell lines.

Induction of B220/CD45R expression on As_2O_3 -treated human and murine T-cell lines

Normal effector T cells undergoing apoptosis at the end of an immune response express B220 on their cell surface. These apoptotic B220⁺ T cells are solely found within the FSC^{int/low} SSC^{high} subset by flow cytometry analysis [15,16]. Interestingly, we observed that As_2O_3 is also able to induce cell-surface expression of B220 on EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL T-cell lines in a dose-dependent manner (Figure 3). However, B220 expression levels differed significantly among these four T-cell lines. Thus, a significantly higher percentage of EL-4 cells, and to a lesser extent of BW5147 and Jurkat cells, expressed B220 compared to HPB-ALL cells (for instance, see 2 μM

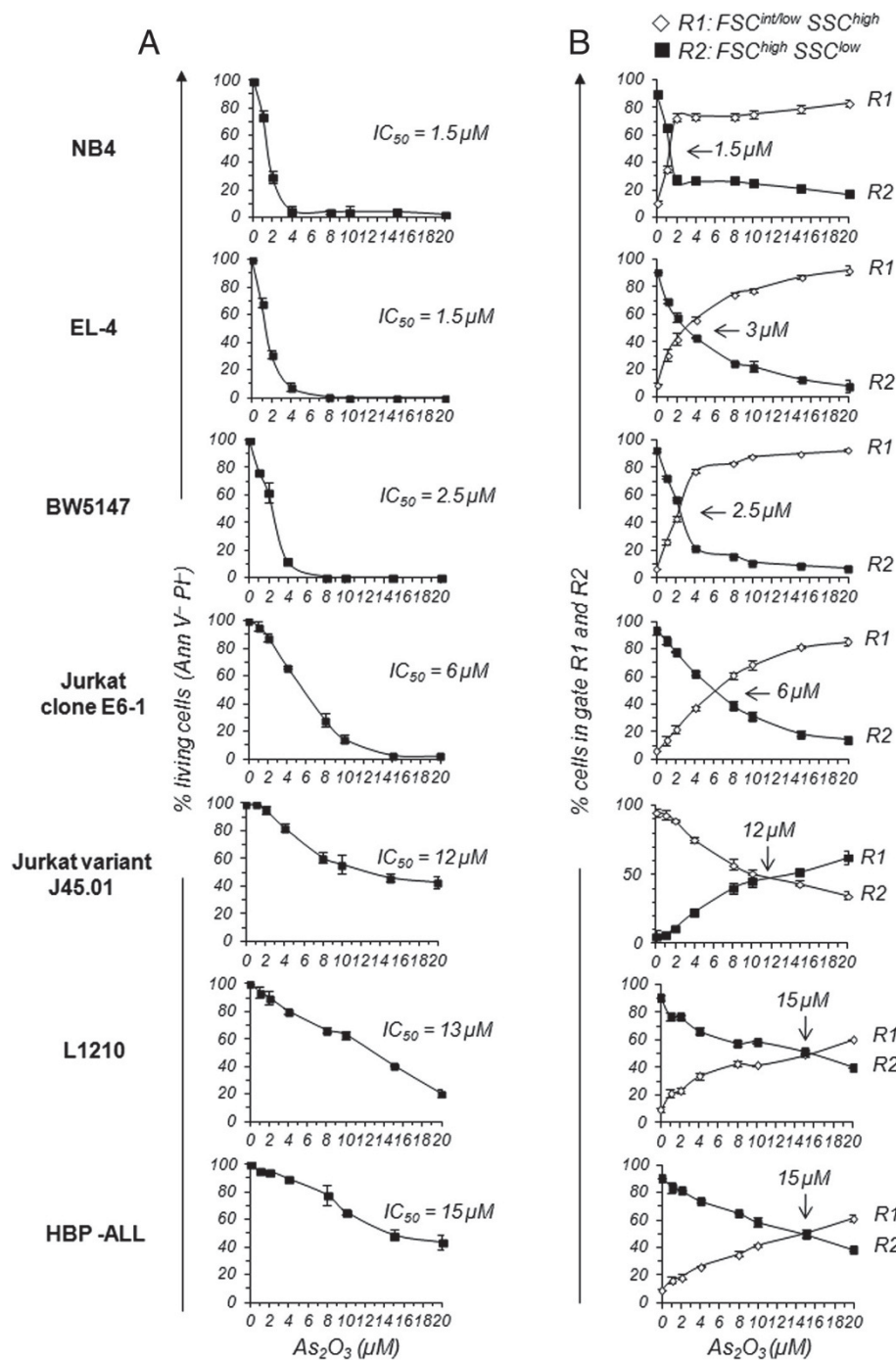
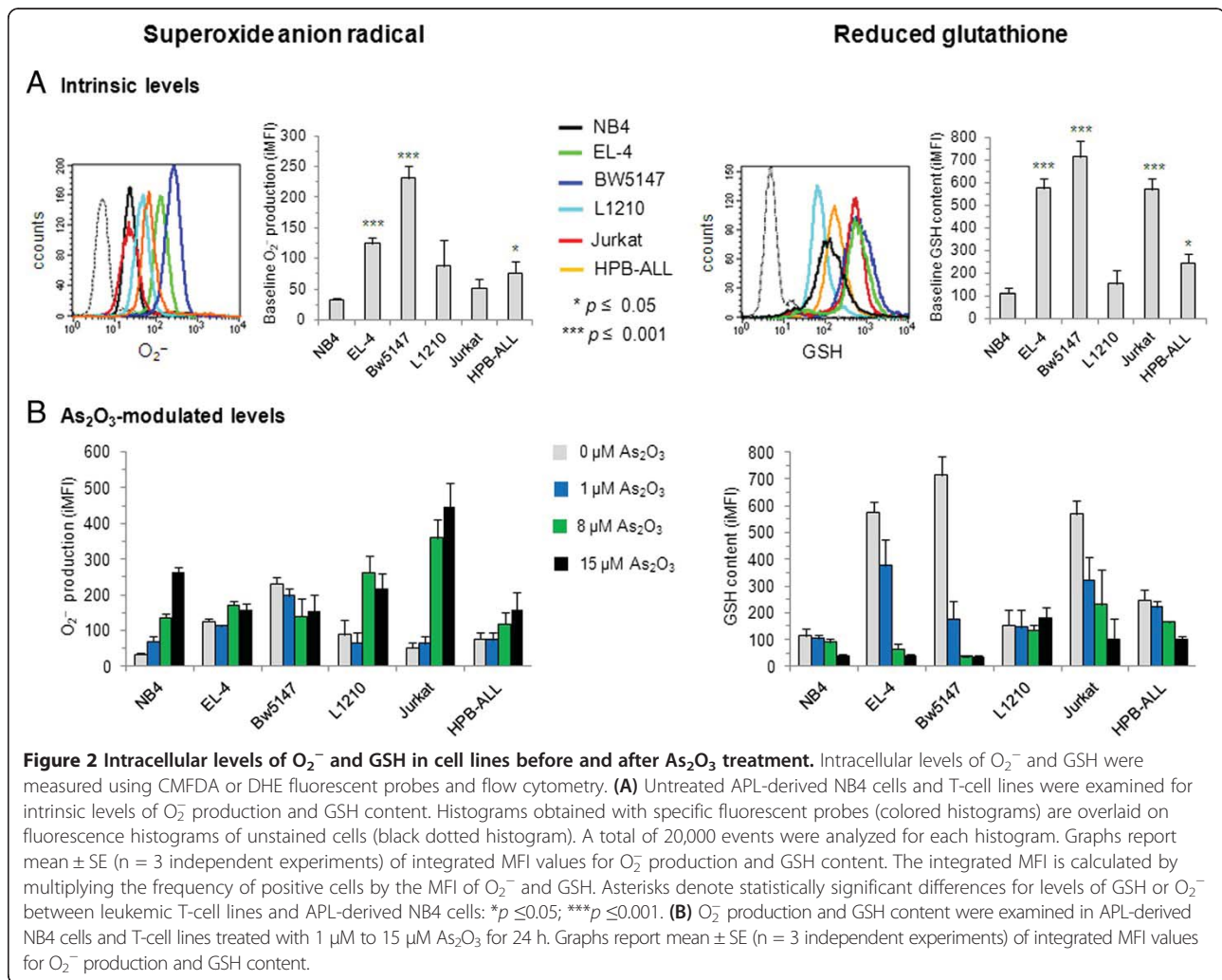


Figure 1 Viability and cell morphology of various T-cell lines cells upon As₂O₃-treatment. (A) APL-derived NB4 cells as well EL-4, BW5147, L1210, Jurkat (clone E6-1), CD45-deficient Jurkat variant (J45.01) and HPB-ALL T-cell lines were treated with As₂O₃ for 24 h with doses ranging from 1 to 20 μM. T-cell lines were then stained with Annexin V and PI, and the percentages of living cells (Ann V⁻ PI⁻) determined by flow cytometry. At least 20,000 events were analyzed for each sample. Graphs show mean percentages ± SE of Ann V⁻ PI⁻ cells from more than 4 independent experiments. IC₅₀ in the graphs indicates the concentration of As₂O₃ that kills 50% of the cells. (B) Cells were analyzed by flow cytometry with respect to size (FSC) and granularity (SSC). Regions R1 and R2 identified on a FSC vs. SSC dot plot encompassed cells with FSC^{intermediate(int)/low}SSC^{high} and FSC^{high}SSC^{low}, respectively. At least 20,000 events were analyzed for each sample. Graphs show mean percentages ± SE of cells located in region R1 (◇) and R2 (■) at the indicated concentration of As₂O₃. Numbers in the graphs indicate the concentration of As₂O₃ at which 50% of the cells shifted from region R2 to region R1. Four independent experiments were performed for NB4 and J45.01 cells, and more than 10 for EL-4, BW5147, L1210, Jurkat and HPB-ALL cells.

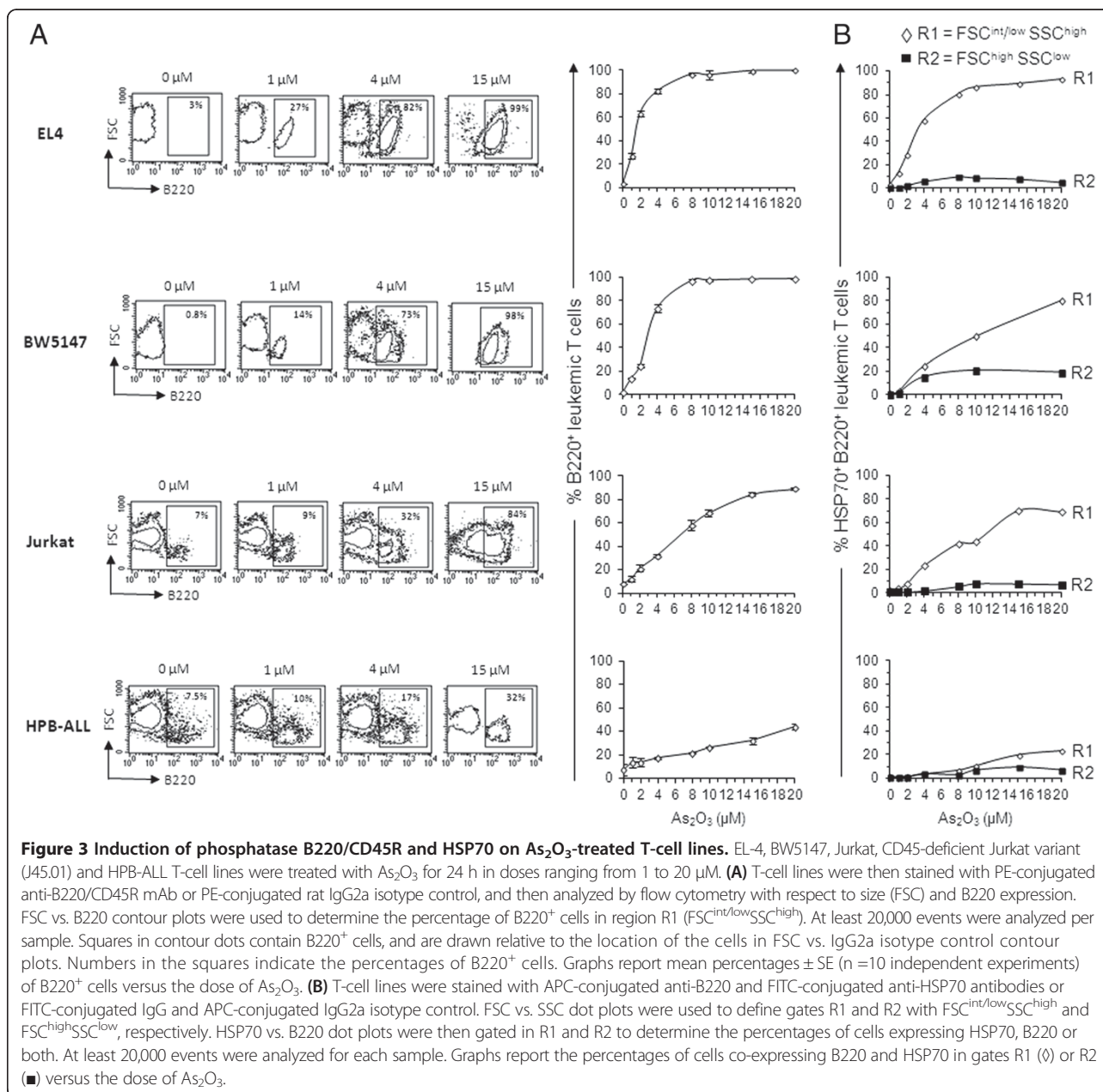


dose in Table 1 or 4 μM dose in Figure 3). B220⁺ leukemic T cells were found in both gate R1 and R2 that contained FSC^{int/low} SSC^{high} dying cells (Figure 3) and FSC^{high} SSC^{low} living cells (data not shown), respectively, although the numbers were significantly higher in gate R1. As_2O_3 also induces B220 expression at the mRNA level in a dose- and time-dependent manner. High levels of B220 mRNA were found in EL-4 and BW5147 within 3 h of treatment with 1 μM As_2O_3 . Higher doses of As_2O_3 (e.g., 4 μM for 3 h) or longer treatment (e.g., 1 μM for 9 h) resulted in increased levels of B220 mRNA (Additional file 1: Figure S1C). In contrast, As_2O_3 did not induce B220 expression on APL-derived NB4 cells (data not shown). To confirm that As_2O_3 -induced cytotoxicity in leukemic T cells and B220 expression are mechanistically related, we analyzed CD45-deficient Jurkat cells (clone J45.01) for their As_2O_3 sensitivity over a large range of doses (1 to 20 μM). As shown in Additional file 1: Figure S1B, J45.01 T-cell line displays a strong reduction in the expression level of CD45 per cell (MFI) compared to wild-type Jurkat cells (MFI J45.01: 40;

MFI Jurkat: 1528; MFI isotype control: 5). The IC₅₀ value for cytotoxicity was around 12 μM for J45.01 compared to 6 μM for wild-type Jurkat cells, corroborating the critical role of the B220 isoform of CD45 in the resistance/sensitivity of leukemic T cells to As_2O_3 .

Unexpectedly, we also found that L1210 T cells constitutively express B220 at the plasma membrane. L1210 cells undoubtedly belong to the T-cell lineage because they coexpress the mouse pan T-cell marker CD90 (Additional file 2: Figure S2A). To the best of our knowledge, we have shown for the first time that B220 can be constitutively expressed at high levels on T cells, in the absence of external stimulation. As_2O_3 treatment did not change either the percentages of B220⁺ L1210 cells, or the expression level of B220 per cell (MFI) (Additional file 2: Figure S2B).

Furthermore, we have compared the subcellular localization and distribution of B220 molecules that were either constitutively expressed on L1210 cells or As_2O_3 -induced on EL-4 cells, using ImageStream device, which allows simultaneous flow cytometry and



fluorescence microscopy analysis on a large numbers of cells. Whole cell and nuclear boundaries were identified using brightfield image and DAPI staining, respectively. In the absence of As₂O₃ treatment, no labeling with anti-B220/CD45R mAb was observed in EL-4 cells (Figure 4A). In contrast, in untreated L1210 cells and 2 μM As₂O₃-treated EL-4 cells, B220 molecules were expressed at high levels with a restricted localization to the cell surface (Figure 4A and B), confirming the results obtained by flow cytometry. However, B220 molecules appeared less uniformly distributed over the plasma membrane of EL-4 cells (Figure 4A) than L1210 cells (Figure 4B). Thus, L1210 cells showed a uniform fluorescence at

the periphery of the cell, whereas a variable number of bright spots of fluorescence were distributed at the periphery of EL-4 cells.

Duration of B220/CD45R membrane expression after As₂O₃ treatment

To determine the duration of B220 expression following As₂O₃ treatment, EL-4 and Jurkat cells were cultured in the presence of 1 to 8 μM As₂O₃ for 24 h. Cells were then extensively washed to eliminate As₂O₃, and cultured in complete medium for 9 additional days. As₂O₃ treatment for 24 h induced B220 expression in a dose-dependent manner (Additional file 3: Figure S3, graphs),

Table 1 Opposite effects of As₂O₃ or Calcium ionophore A23187 on a panel of leukemic T-cell lines

T-cell lines	As ₂ O ₃ (2 μM*)				Calcium ionophore A23187 (100 nM)			
	B220 upregulation**	CD69 upregulation**	HSP70 upregulation**	Cell death***	B220 upregulation**	CD69 upregulation**	HSP70 upregulation**	Cell death***
EL-4	63	No	35	70	7	Yes	no	1
BW5147	30	No	20	39	19	Yes	no	25
Jurkat clone E6-1	22	No	10	12	30	Yes	no	28
HPB-ALL	10	No	3	5	80	Yes	no	75
L1210	Constitutive expression	No	5	10	Constitutive expression	Yes	no	55

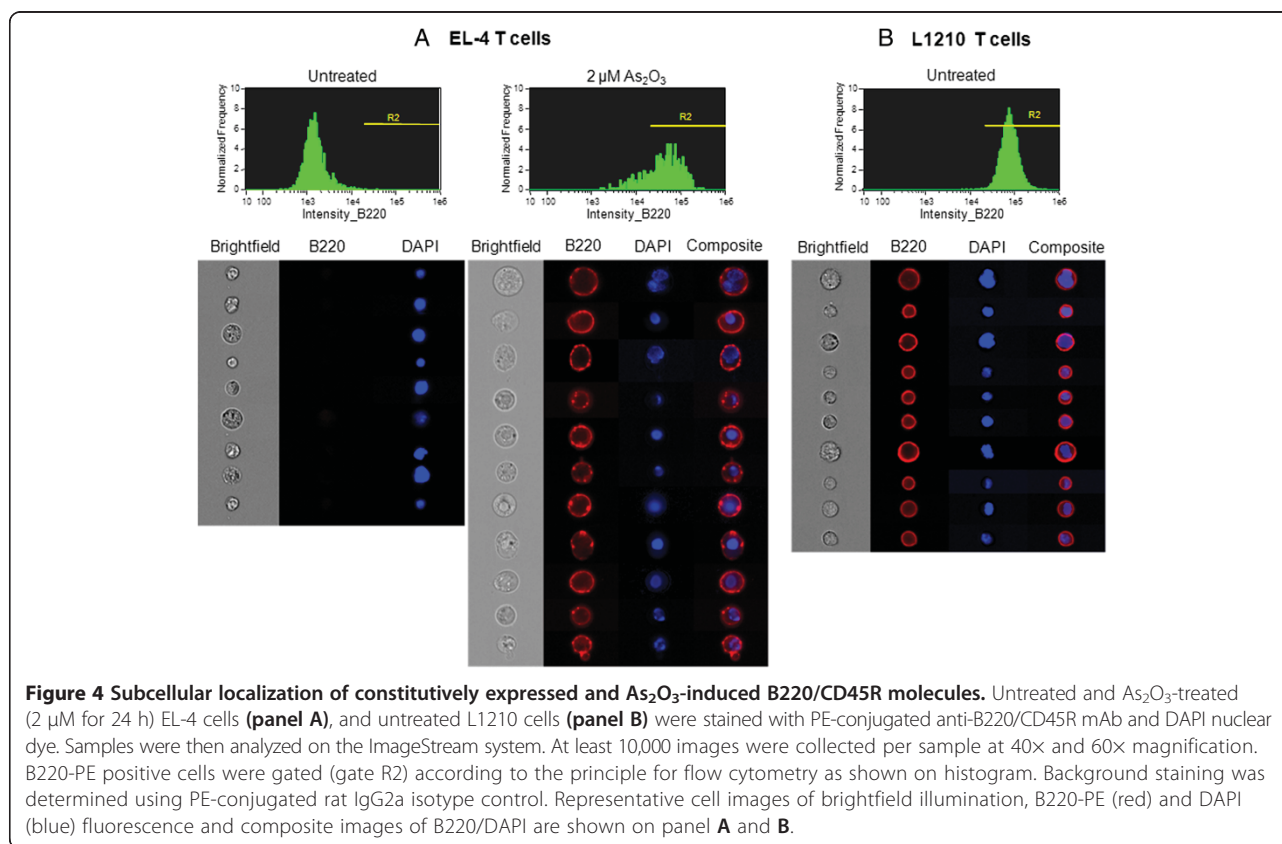
*a clinically relevant concentration of As₂O₃.

**percentage of positive cells determined by flow cytometry.

***percentage of PI⁺ cells (either Annexin V⁻ or Annexin V⁺) determined by flow cytometry.

particularly on EL-4 cells, corroborating the findings reported in Figure 3. On day 1 post-treatment, and at concentrations of 1 μM and 8 μM As₂O₃, the percentages of B220⁺ EL-4 cells were around 50% and 95%, respectively. One week later, the percentage of B220⁺ EL-4 cells fell below 15% at 1 μM As₂O₃, whereas it remained at 90% at the concentration of 8 μM (Additional file 3: Figure S3, graphs). Likewise in Jurkat cells, on day 7 post-treatment, around 50% of cells treated with 8 μM As₂O₃ expressed B220 (Additional file 3: Figure S3, dot plots and graph), while B220 could no longer be detected on Jurkat cells

treated with 1 to 4 μM As₂O₃ (Additional file 3: Figure S3, graph). The loss of B220 expression on EL-4 and Jurkat cells was accompanied by a decreased cell number in gate R1 (FSC^{int/low} SSC^{high}) and an expansion of viable cells in gate R2 (Additional file 3: Figure S3, dot plots, see days 7 and 9). The duration of B220 expression in gate R1 was dependent on the dose of As₂O₃ treatment. Thus, a longer duration of B220 expression was associated with a higher concentration of As₂O₃, and a higher number of B220⁺ cells at the time of As₂O₃ removal. The decrease in the percentages of B220⁺ cell population could be due to the



death of B220⁺ cells, and/or the proliferation of the remaining B220⁻ cells. However, even on day 9 post-treatment, EL-4 and Jurkat cells had not fully recovered their initial proliferative capacity (data not shown). Our data suggest that dead B220⁺ T cells release their As₂O₃ content into the medium, which is subsequently recaptured by living B220-negative T cells. The amount of released As₂O₃ is dependent on the dose used at the time of treatment.

Expression of membrane-bound HSP70 on As₂O₃-treated T-cell lines parallels the induction of B220/CD45R

Heat shock protein 70 (HSP70) is upregulated intracellularly in response to a variety of stresses including chemical or chemotherapeutic agents. HSP70 proteins can also be found at the cell surface of some tumor cells. Notably, membrane-bound HSP70 has been shown to elicit antitumor immunity [26,27]. Therefore, HSP70 and B220 expression was determined by flow cytometry on the plasma membrane of the T-cell lines treated with As₂O₃ for 24 h in doses ranging from 1 to 20 μM. HSP70 was not detected on untreated T-cell lines (Figure 3B). As₂O₃ treatment upregulated membrane-bound HSP70 in EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL cells in a dose-dependent manner. The expression pattern of HSP70 was parallel to that of B220, and HSP70 was expressed in B220⁺ cells only (Figure 3B). As observed for B220 expression, a significantly higher percentage of EL-4 cells, and to a lesser extent of Jurkat cells, than HPB-ALL cells expressed HSP70 (Figure 3B) (Table 1). L1210 cells, constitutively expressing B220, had a low level of expression of membrane-bound HSP70 (Additional file 2: Figure S2C) similar to HSP70 levels observed in HPB-ALL cells. Therefore, As₂O₃ treatment induced both HSP70 and B220 membrane expression and the levels of expression correlated with leukemic T-cell lines sensitivity to As₂O₃.

B220/CD45R expression on As₂O₃-treated leukemic T cells is not a direct consequence of T-cell activation unlike the expression induced by the calcium ionophore A23187

The induction of B220 on EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL leukemic T cells treated with As₂O₃ is suggestive of the induction observed on normal T cells entering apoptosis after repeated activation by their antigen. T-cell activation can be evidenced by measuring the expression of surface marker CD69 [28]. Therefore, we have analyzed the induction of CD69 on the T-cell lines treated with As₂O₃ as well as with PMA and calcium ionophore A23187 as positive controls. As expected, the activation of leukemic T cells with 10 ng/ml of PMA for 5 h induced a strong expression of the activation marker CD69 in cells within region R2 only, which encompasses living cells. In contrast, we did not detect the expression of CD69 by

flow cytometry on the cell surface of As₂O₃-treated leukemic T cells, whatever the doses tested (1 to 20 μM, data not shown), suggesting that the induction of B220 expression by As₂O₃ is not a direct consequence of T-cell activation.

As observed with PMA, activation of the leukemic T-cell lines with 100 nM to 800 nM of the calcium ionophore A23187 for 24 h induced the expression of CD69 on EL-4, BW5147, L1210, and Jurkat cells and also, to a lesser extent, on HPB-ALL cells (Table 1). However, the number of CD69⁺ cells decreased with the dose of A23187, and hardly any CD69⁺ cells were detected at the higher dose of A23187 (data not shown). In contrast, a dose-dependent expression of B220 was detected on EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL cells, although significant differences were observed in the percentages of B220⁺ cells among T-cell lines (Figure 5). Thus, 50% of B220⁺ cells were detected at a dose of A23187 around 50 nM for HPB-ALL cells, 100–130 nM for Jurkat cells, 275 nM for BW5147 and 600 nM for EL-4 cells (Figure 5, see B220 induction). Interestingly, at around the same dose of A23187 that induced B220 expression, 50% of HPB-ALL, Jurkat, BW5147 and EL-4 cells died (Annexin V and PI staining, Figure 5, see Cell viability) or shifted from region R2 to R1 on the FSC vs. SSC dot plots (Figure 5, see Cell morphology). In contrast to As₂O₃, the constitutive expression of B220 on L1210 T cells renders these cells remarkably sensitive to A23187 (Figure 5, see Cell viability and Cell morphology). Therefore, B220 expression level strictly correlates with the susceptibility of T cells to die following A23187 activation, suggesting an interesting link between transmembrane phosphatase B220 expression and cell death. Moreover, in contrast with As₂O₃ treatment, membrane-bound HSP70 was not upregulated following treatment with calcium ionophore A23187, even on the B220⁺ T-cell subpopulations (data not shown).

Relative contributions of apoptosis and necrosis in T leukemia cell death induction by As₂O₃ or calcium ionophore A23187

It is widely considered that As₂O₃ exerts its cytotoxic activity by triggering cell apoptosis [12]. However, it has been reported that As₂O₃ can induce cell death independently of caspase activity [29,30]. We have determined whether the apoptotic and/or necrotic pathways were activated upon As₂O₃ or calcium ionophore A23187 treatment in EL-4, Jurkat, HPB-ALL and L1210 cells. Because BW5147 cells displayed similar sensitivity to As₂O₃ and A23187 as EL-4 and Jurkat cells, respectively, the latter two T-cell lines were preferentially chosen for subsequent experiments. In the presence of As₂O₃ or A23187, no PI⁺ cells (either Annexin V⁻ or Annexin V⁺) were detected in the B220-negative cell

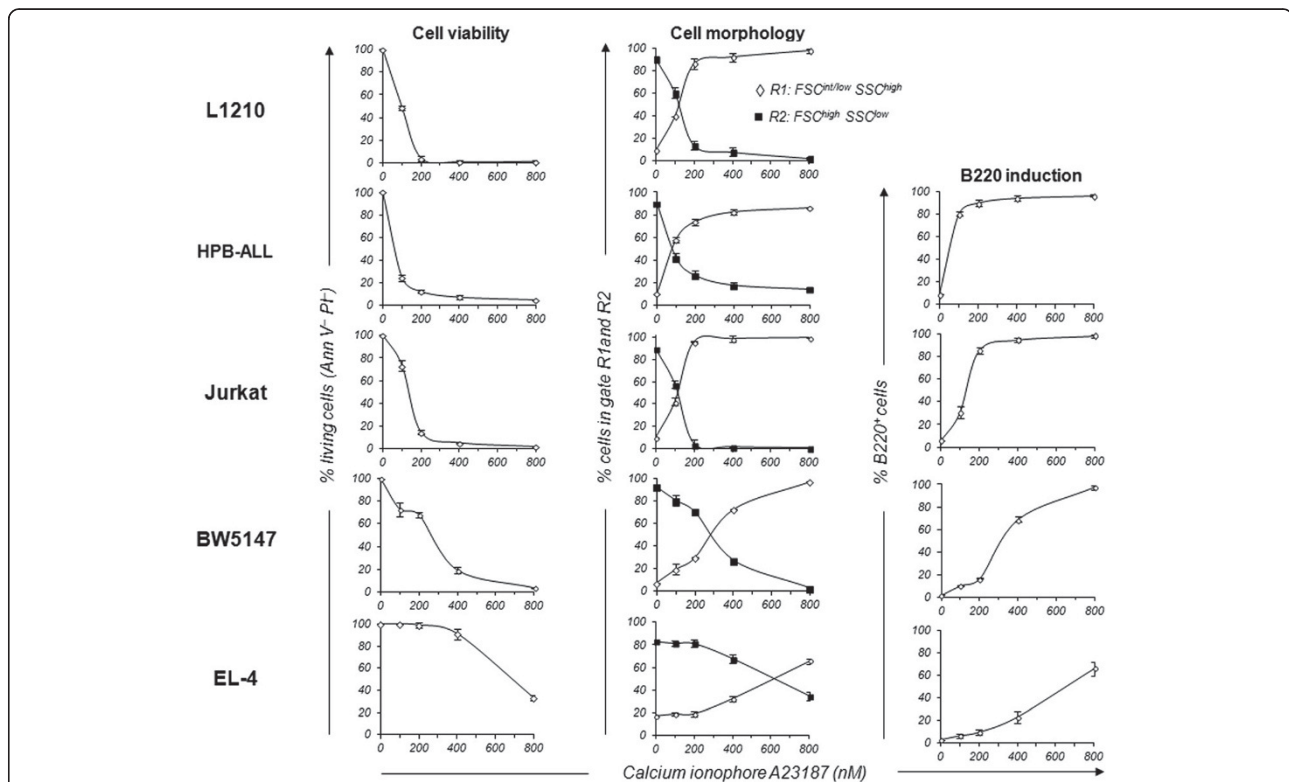
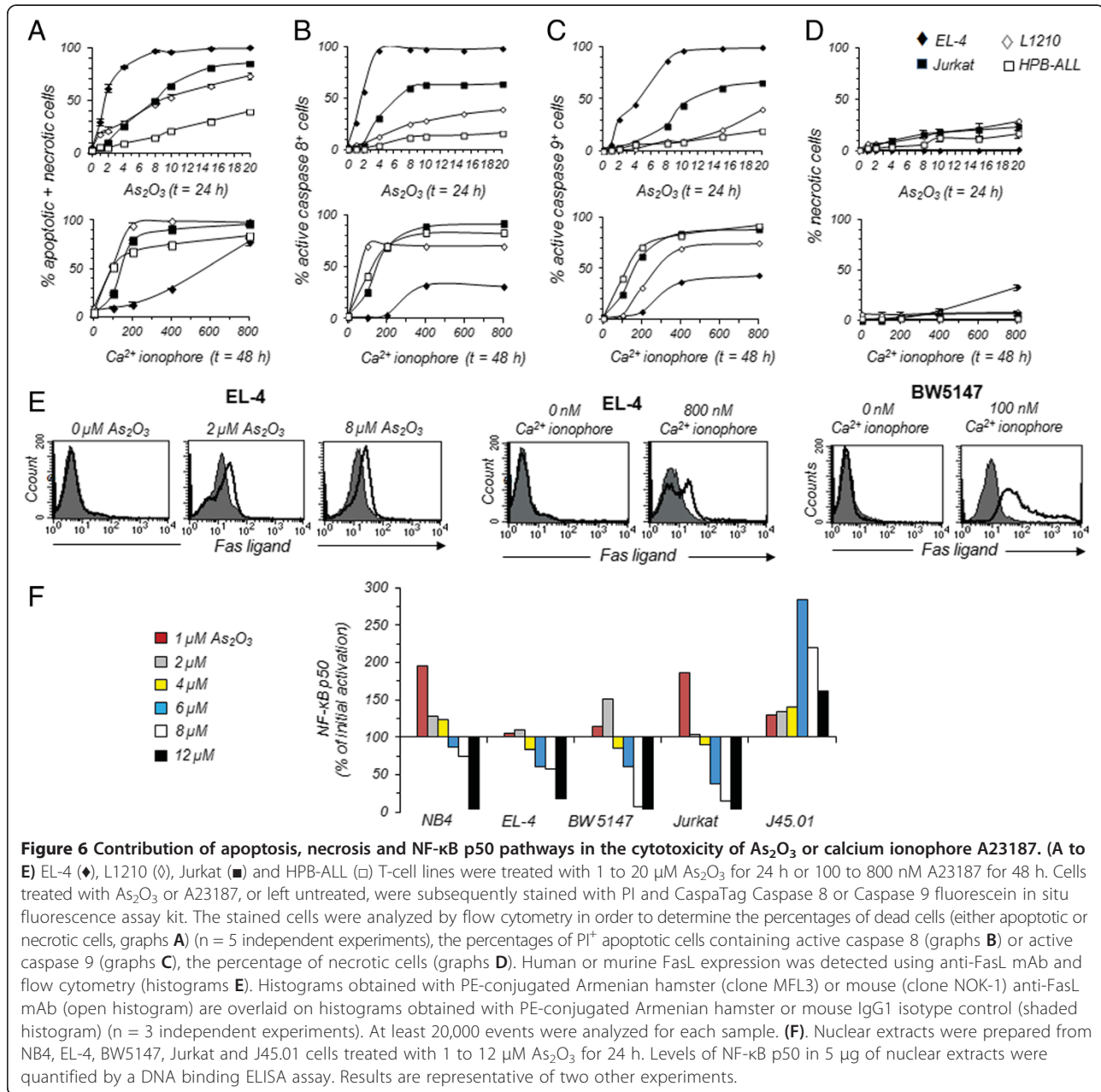


Figure 5 Cell viability, cell morphology and B220/CD45R induction in T-cell lines stimulated with calcium ionophore A23187.

Jurkat, HPB-ALL, L1210, EL-4 and BW5147 cells were treated with Calcium ionophore A23187 for 48 h in doses ranging from 100 to 800 nM. *Cell viability measurement.* Untreated and A23187-treated cells were stained with Annexin V and PI, and the percentages of living cells (Ann V⁻ PI⁻) determined by flow cytometry. Graphs show mean percentages \pm SE of Ann V⁻ PI⁻ from 4 independent experiments. *Cell morphology analysis.* Untreated and A23187-treated cells were analyzed by flow cytometry with respect to size (FSC) and granularity (SSC). Regions R1 (\diamond) and R2 (\blacksquare) identified on FSC vs. SSC dot plots encompassed cells with FSC^{int/low}SSC^{high} and FSC^{high}SSC^{low}, respectively. *B220 induction.* Untreated and A23187-treated T-cell lines were stained with anti-B220/CD45R mAb and analyzed by flow cytometry. Graphs report mean percentages \pm SE (n = 4 independent experiments) of B220⁺ EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL cells at the indicated concentration of A23187. At least 20,000 events were analyzed per sample in all experiments reported in the graphs.

subpopulation (data not shown). In contrast, in the B220⁺ cell subpopulation, the IC₅₀ value of As₂O₃ that causes either apoptotic or necrotic cell death was 1.5 μ M for EL-4 cells, 8 μ M for Jurkat cells and 9 μ M for L1210 cells. For B220⁺ HPB-ALL cells, even at the higher dose of 20 μ M As₂O₃, only 39 \pm 2.5% of the cells were killed (Figure 6A). Furthermore, to discriminate between late apoptosis (PI⁺/Annexin V⁺) and necrosis (PI⁺/Annexin V⁻), we analyzed the levels of active initiator caspases 8 and 9 in the B220⁺ PI⁻-cell subpopulation. Significant differences were observed between the T-cell lines, even though the levels of active caspase 8 and/or 9 increased with the dose of As₂O₃ (Figure 6B and C). Thus, EC₅₀ for caspase 8 activation was 2 μ M for EL-4 cells and 6.5 μ M for Jurkat cells (Figure 6B). To activate caspase 9 in these T-cell lines, almost twice as much As₂O₃ was required compared with caspase 8 (Figure 6C). Even at the higher dose of 20 μ M As₂O₃, only 16 to 19% of HPB-ALL cells and ~40% of L1210 cells contained active caspase 8 or caspase 9 (Figure 6B and C). Since As₂O₃ can also induce cell

death independently of caspase activity [30], we have determined the percentages of necrotic cells (PI⁺/Annexin V⁻ or PI⁺/active Caspase⁻). No necrotic cells were detected in As₂O₃-treated EL-4 cells. In contrast, 4 to 29% necrotic cells were detected in As₂O₃-treated Jurkat, HPB-ALL and L1210 cells (Figure 6D). In agreement with Figure 4, the IC₅₀ value of calcium ionophore A23187 that cause either apoptotic or necrotic cell death was between 80 nM and 150 nM for L1210, HPB-ALL and Jurkat cells compared with around 600 nM for EL-4 cells (Figure 6A). The relative contributions of apoptotic and necrotic cell death in calcium ionophore A23187 cytotoxicity showed an opposite pattern compared with As₂O₃ cytotoxicity. In the presence of calcium ionophore A23187, up to 32% necrotic cells were detected in EL-4 cells, whereas no necrotic cells were detected in HPB-ALL cells and less than 8% were detected in L1210 and Jurkat cell lines (Figure 6D). Moreover, EL-4 cells did not contain active caspase 8 and 9, whereas high levels of active caspase 8 and 9 were detected in L1210, HPB-ALL, and Jurkat T-cell lines (Figure 6B and C).



To summarize, when high levels of B220 membrane expression were achieved with low doses of As_2O_3 or calcium ionophore A23187, the leukemic T-cell lines died by apoptosis only. When high doses of As_2O_3 or calcium ionophore A23187 were required to induce B220 expression, the T-cell lines died by both apoptosis and necrosis. The constitutive expression of B220 on L1210 cells did not favor apoptosis or necrosis, and cells died by a combination of the two. Taken together, our data suggest that transmembrane tyrosine phosphatase B220 plays a checkpoint role in apoptotic pathways since its expression is markedly and rapidly induced on the surface of T cells undergoing apoptosis.

Expression of Fas and Fas ligand upon treatment with As_2O_3 or A23187

The presence of active initiator caspase 8 in the T-cell lines treated with A23187 or As_2O_3 suggested that cells entered apoptosis upon engagement of death receptors such as Fas. In normal T cells, Fas receptor is constitutively expressed whereas its ligand, FasL, is expressed after T cell activation. The five T-cell lines were treated or not with As_2O_3 or calcium ionophore A23187 for 24 h and 48 h, and the levels of Fas and FasL expression were determined by flow cytometry. Fas receptor is strongly expressed on untreated Jurkat cells, weakly expressed on untreated HPB-ALL cells, and not detected

on untreated EL-4, BW5147 and L1210 cells. No significant modulation in Fas receptor expression was observed after treatment with As₂O₃ or A23187 (data not shown). Its ligand, FasL, is not expressed on untreated T-cell lines. Upon treatment with 2 μM As₂O₃ for 24 h, only the highly As₂O₃-sensitive EL-4 T-cell line expressed FasL, with 100% of EL-4 cells being FasL positive although weakly (Figure 6E). FasL⁺ EL-4 cells were equally detected in regions R1 and R2 (data not shown), suggesting that FasL is expressed before apoptosis. FasL-expressing BW5147, L1210, Jurkat and HPB-ALL cells were not detected even after 48 h of treatment with As₂O₃ (data not shown).

Treatment with the calcium ionophore A23187 upregulated FasL expression on EL-4, BW5147 and L1210 cells (Figure 6E and Additional file 2: Figure S2D), but not on Jurkat and HPB-ALL cells (data not shown). While 24 h of treatment were sufficient to induce FasL expression on BW5147 and EL-4 cells, 48 h were required to induce such expression on L1210 cells (Additional file 2: Figure S2D). However, the expression levels of FasL were significantly higher on BW5147 cells than on EL-4 and L1210 cells. In addition, FasL upregulation was achieved using a concentration of calcium ionophore A23187 around 4 and 8 times higher in EL-4 cells and L1210 cells, respectively, than in BW5147 cells. FasL-expressing EL-4, BW5147 and L1210 cells were equally detected in regions R1 and R2 (data not shown). The expression of FasL on EL-4 cells treated with As₂O₃ or A23187, and on BW5147 and L1210 cells only when treated with A23187, strongly suggest that As₂O₃ and A23187 trigger FasL expression through different signaling pathways. Furthermore, the absence of either Fas or FasL, or both, on As₂O₃- or A23187-treated cells indicates that their activation of caspase 8 is independent of the Fas/FasL pathway and must depend on other death pathway.

As₂O₃ treatment represses nuclear translocation of NF-κB p50

NF-κB activity regulates the apoptosis of various cancer cell lines. Activation of NF-κB can promote or prevent apoptosis, depending on the stimuli utilized and the cell type [31]. Conflicting results have been published on the activation status of NF-κB in As₂O₃-treated leukemia T cells. One report has shown that As₂O₃ treatment markedly decreases constitutive NF-κB activation [32]. In another study, the authors could not detect any decrease in the translocation of the p65 subunit of NF-κB [33]. This discrepancy may be due to differences in the doses of As₂O₃ used to treat leukemic T cells. Therefore, we have quantified NF-κB p50 in nuclear extracts from NB4, EL-4, BW5147, Jurkat (clone E6-1) and CD45-deficient variant (clone J45.01) treated with a large range

of doses (i.e. 1 μM to 12 μM). We found that As₂O₃ treatment represses nuclear translocation of NF-κB p50 in As₂O₃-treated T cells in a dose-dependent manner (Figure 6F). Importantly, nuclear translocation of NF-κB p50 was strongly increased in the CD45-deficient Jurkat T-cell line (clone J45.01) treated with As₂O₃ compared to wild-type Jurkat cells (Figure 6F). Thus, after a treatment with 6 μM As₂O₃ (IC₅₀ value for the cytotoxic effect of As₂O₃ on Jurkat cells) J45.01 cells contained markedly more nuclear NF-κB p50 (about 3 times more) than wild-type Jurkat cells, suggesting a link between B220 and NF-κB signaling pathways.

Discussion

In APL-derived NB4 cells, As₂O₃ triggers apoptosis at concentrations of 0.5 to 2 μM [8]. The cytotoxic properties of As₂O₃ are not restricted to APL, and As₂O₃ induces apoptosis in various types of hematopoietic and solid tumors [12]. However, hematologic tumor cells vary considerably in their sensitivity to As₂O₃. To gain insight into the mechanisms underlying the As₂O₃ sensitivity of malignant T cells, we firstly selected two human (Jurkat and HPB-ALL) and three murine (EL-4, BW5147 and L1210) T-cell lines for their marked differences in sensitivity to As₂O₃ cytotoxicity over a large range of doses (i.e. 1 μM to 20 μM). Thus, 50% of EL-4 cells are killed at a clinically relevant concentration of about 1–2 μM As₂O₃, whereas concentrations of ~2.5 μM As₂O₃ for BW5147, ~6 μM As₂O₃ for Jurkat and ~12–15 μM As₂O₃ for L1210 and HPB-ALL T-cell lines are required to kill approximately 50% of the cells. Using this tumor panel, we have shown that: 1) differences in the intracellular levels of GSH and O₂⁻ are not sufficient to account for their differences in As₂O₃ sensitivity; 2) transmembrane tyrosine phosphatase B220 is induced on EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL T-cell lines, but not APL-derived NB4 cells, upon treatment with As₂O₃ in a dose and time dependent manner; 3) the degree of B220 induction on the T-cell lines is strongly correlated with the sensitivity to As₂O₃ cytotoxicity; 4) surprisingly, B220 is constitutively expressed on the L1210 T-cell line; 5) membrane-bound HSP70, known to induce antitumor immunity, is upregulated by As₂O₃ in parallel with B220 induction; 6) initiator caspases 8 and 9 are activated by As₂O₃ in the T-cell lines where this activation parallels B220 induction, but not in L1210 cells; 7) As₂O₃ represses nuclear translocation of NF-κB p50 in a dose dependent manner; 8) FasL upregulation by As₂O₃ is found on Fas-negative EL-4 cells only, indicating that caspase 8 activation is most probably independent of the Fas/FasL pathway [34]. However, the absence of FasL on some T-cell lines (either human or murine) might be due to the rapid shedding of FasL by protease activities induced by As₂O₃ or calcium ionophore

A23187, as we have reported for TNF- α and CD62L upon treatment with Ionomycin or ATP [35].

Contradictory data have been published on the efficacy of As₂O₃ treatment against tumors belonging to the lymphoid lineages. Evidence for a pro-apoptotic effect of As₂O₃ against human malignant T- and B-cell lines [36], cutaneous T-cell lymphoma [37] or HTLV-I-associated adult T-cell leukemia [38] was provided by in vitro studies. However, it has been shown, in a multi-institution phase II study, that As₂O₃ exhibits limited efficacy against lymphoid malignancies, even though the patients received ascorbic acid in addition to As₂O₃ [39]. The authors of this clinical study expected that agents such as ascorbic acid, which depletes intracellular GSH, could potentiate arsenic-induced apoptosis, since it has been described previously [10] that the sensitivity of cells to As₂O₃ are inversely correlated with their intracellular GSH content. As₂O₃ interacts with sulfhydryl (SH) groups of biologically active molecules. The binding of As₂O₃ to the SH group of GSH could cause a drastic decrease in the capacity to scavenge ROS in cells with a low basal GSH content, resulting in overproduction of intracellular ROS that could trigger cell apoptosis. However, our present study shows that EL-4 and BW5147 T-cell lines, which were the most sensitive to As₂O₃-induced cytotoxicity among the cells lines studied (IC₅₀ of approximately 1 to 2.5 μ M) had the highest baseline GSH content (Figure 2). Likewise, L1210 and HPB-ALL T cells that were significantly more resistant to As₂O₃ cytotoxicity (IC₅₀ of approximately 12 to 15 μ M) had significantly lower baseline GSH content than EL-4 and BW5147 cells (Figure 2). In the presence of As₂O₃, intracellular GSH content was differently modulated in the T-cell lines, but without any correlation with their As₂O₃ sensitivity. Thus, GSH level in the highly sensitive NB4 cell line was unaffected by the dose of 1 μ M As₂O₃, whereas it was markedly decreased in the BW5147 T-cell line and also, although to a lesser extent, in the resistant Jurkat cells (Figure 2). Because intracellular GSH content did not appear to be a key factor in determining As₂O₃ sensitivity of these five leukemia T-cell lines, we further explored the evolution of O₂⁻ production upon treatment with As₂O₃. The five T-cell lines showed a great heterogeneity in levels of intrinsic O₂⁻ production (Figure 2), which, interestingly, were 2 to 8 times higher than in APL-derived NB4 cells. As expected, the levels of O₂⁻ were significantly increased in APL-derived NB4 cells in the presence of As₂O₃. In T-cell lines, the situation was more complex. While the levels of O₂⁻ increased significantly, in Jurkat, L1210, and to a lesser extent HPB-ALL T cells treated with As₂O₃, they remained unchanged in EL-4 and BW5147 T cells. Therefore, the changes of O₂⁻ production upon treatment with As₂O₃ are not correlated with the differences in As₂O₃ sensitivity that we observed

among the five T-cell lines. In contrast to other tumor cells [5], neither the intracellular GSH content nor the production of O₂⁻ had any decisive effect on As₂O₃-induced apoptosis of the five T-cell lines studied. Therefore, our findings suggest that the depletion of leukemic T cells in their intracellular GSH content by ascorbic or butyric acid are not necessarily relevant to potentiate the cytotoxic effect of As₂O₃. Furthermore, it has been reported that the expression level of aquaglyceroporin (AQP)9, a transmembrane protein that controls arsenic transport, correlated positively with As₂O₃-induced cytotoxicity in myeloid and lymphoid leukemia cell lines [40]. In contrast, the overexpression of AQP9 in melanoma cells significantly increased the resistance to arsenite-induced apoptosis [41]. These reports prompted us to determine the levels of AQP9 mRNA by semi-quantitative RT-PCR in EL-4, BW5147, L1210, Jurkat and HPB-ALL T-cell lines, and in APL-derived NB4 cells. However, we did not find any correlation between the expression levels of AQP9 mRNA and the As₂O₃ sensitivity in the T-cell lines (unpublished data). Therefore, our data strongly suggest the existence of additional factors determining the sensitivity of T cells to As₂O₃ cytotoxicity. Herein, we have hypothesized that phosphatase B220 could be such a factor, since we have shown previously that treatment with As₂O₃ of autoimmune MRL/lpr mice selectively eliminates pathogenic B220-expressing T cells in vivo [13,14].

Normal effector T cells entering apoptosis after repeated activation by their antigen express the tyrosine phosphatase B220 on their surface [15,16,42], suggesting a role for B220 induction in the transition from activation to apoptosis. On the other hand, B220 is the isoform of CD45 predominantly expressed on pathogenic DN T cells from patients and mice with a deficiency in the death receptor Fas, or its ligand FasL. FasL-deficient mice (*gld* mutation) with only one functional CD45 allele (*gld/gld*, *CD45+/-*) display a strong reduction in the pathogenic DN T-cell population [43], suggesting that CD45 is an important regulator of T-cell apoptosis or a survival factor for T cells. Whether and how B220 expression on T cells regulates signaling for death or survival remains unknown. The induction of B220 and FasL (in EL-4 cells) as well as the activation of initiator caspase-8 in As₂O₃-treated leukemic T-cell lines were reminiscent of apoptosis in normal effector T cells triggered by repeated antigenic stimulation. Therefore, leukemic T-cell lines were activated with calcium ionophore A23187, a well-known trigger for T-cell activation and death. Importantly, we found that As₂O₃ and calcium ionophore A23187 have opposite efficiencies on the T-cell lines, evidenced by the induction of B220, activation marker CD69 and membrane-bound HSP70 expression, and cell death (data summarized in Table 1). While both

B220 expression and cell death were massively induced in EL-4 cells after treatment with As₂O₃, they were only slightly induced after treatment with calcium ionophore A23187. The complete reverse situation was observed in HPB-ALL cells, indicating that A23187 and As₂O₃ had opposite effects on B220 expression and cell death on the same leukemic T-cell panel. Moreover, treatment with A23187, but not As₂O₃, induced the activation marker CD69 on T-cell lines before B220 expression and cell death, indicating that A23187, but not As₂O₃, kills the T-cell lines by an activation-induced cell death mechanism.

HSP70 is overexpressed in various cancer cells [44]. HSP70 inhibits apoptosis by modulating multiple events within apoptotic pathways, which might promote cancer development [45,46]. However, a tumor-specific plasma membrane form of HSP70 has been described [44,47], which facilitates tumor rejection by the immune system [27,47-49]. In the present study, we found a strong up-regulation of membrane-bound HSP70 by As₂O₃ treatment, but not by the calcium ionophore A23187. This upregulation of HSP70 by As₂O₃ strictly paralleled the induction of B220 on EL-4, BW5147, Jurkat and HPB-ALL T-cell lines (Table 1). Consequently, As₂O₃-sensitive EL-4 cells expressed both high levels of HSP70 and B220, whereas low expression levels of HSP70 and B220 were found on As₂O₃-resistant HPB-ALL cells. Likewise, constitutive expression of B220 on As₂O₃-resistant L1210 cells was associated with low expression levels of membrane-bound HSP70. In vivo, the direct cytotoxic effects of As₂O₃ could be amplified by the upregulation of membrane-bound HSP70 on tumor cells, which might facilitate tumor immune rejection.

CD45 is known to positively regulate antigen-receptor signaling during activation of normal T and B cells via dephosphorylation of src kinases, and to negatively regulate cytokine receptor signaling via dephosphorylation of JAK kinases [17,18]. In this study, we show that the modulation of B220 cell surface expression plays an important role in determining the sensitivity of leukemic T cells to As₂O₃ and calcium ionophore A23187 cytotoxicity. In addition, we found that As₂O₃ treatment represses nuclear translocation of NF-κB p50 in a dose dependent manner. Moreover nuclear translocation of NF-κB p50 was increased in CD45-deficient Jurkat T cell line (clone J45.01) after treatment with As₂O₃, suggesting a link between B220 and NF-κB signaling pathways.

In conclusion, on a panel of mouse and human leukemic T-cell lines, we have presented evidence for a tight correlation between the induction of B220 membrane expression and their sensitivity to cell death induced by As₂O₃ or A23187. Our data strongly support the hypothesis that B220 plays a checkpoint role in death pathways. This could provide additional tools to potentiate As₂O₃ therapy against leukemic T cells.

Conclusions

In contrast to As₂O₃-treated APL cells, GSH content and O₂⁻ production do not play a significant role in As₂O₃ sensitivity of leukemic T cells, suggesting the existence of additional factors determining the sensitivity of T cells to As₂O₃ cytotoxicity. The B220 isoform of transmembrane tyrosine phosphatase CD45 may be one such factor. Indeed, we show that As₂O₃ treatment induces B220 plasma membrane expression and cell death in leukemic T-cell lines in a dose and time dependent manner. The levels of B220 induction on the T-cell lines strictly correlate with both the extent and form of cell death. Leukemic T cells died by an apoptotic form of cell death when high levels of B220 membrane expression were achieved with low doses of As₂O₃. Taken together, our data suggest that transmembrane tyrosine phosphatase B220 plays a checkpoint role in apoptotic pathways since its expression is markedly and rapidly induced on the surface of T cells undergoing apoptosis.

Materials and methods

Reagents

Arsenic trioxide (As₂O₃), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and Calcium ionophore A23187 was from Calbiochem (EMD Biosciences Inc, San Diego, CA). As₂O₃ was dissolved in 1 M NaOH, and stored as a 330 mM stock solution, which was further diluted to 5 mM with phosphate-buffered saline (PBS).

Cell culture and cell treatment

Leukemic cell lines used in this study included mouse T-cell lines EL-4, BW5147 and L1210, human T-cell lines HPB-ALL, Jurkat (clone E6-1) and CD45 deficient variant of the E6-1 clone of Jurkat (clone J45.01) (European Collection of Cell Cultures), and human acute promyelocytic leukemia cell line NB4. Leukemic T cell lines (EL-4, BW5147, L1210, Jurkat (clone E6-1), HPB-ALL), and APL derived cell line NB4 were kindly provided by Dr Colette Kanellopoulos-Langevin (Centre for Inflammation Research, INSERM, Hôpital Bichat, Paris, France) and Dr Jacqueline Robert-Lézénès (Inserm U940, Hôpital Saint-Louis, Paris, France), respectively. All cells were grown in RPMI 1640 containing Glutamax (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. This culture medium will be referred to as complete medium. To avoid possible effects of cell density on cell growth and survival, cells were maintained at less than 5 × 10⁵ cells/ml with daily adjusting cell density through the addition of fresh

medium. Cell viability was estimated by the 4% Trypan-blue dye exclusion assay.

Leukemic T cells were seeded in 12-well plates at a density of 1×10^5 cells/ml and incubated in complete medium alone or in the presence of different concentrations of As₂O₃ or calcium ionophore A23187 at 37°C for 12, 24 and 48 h depending on the experiment.

Flow cytometry and imaging flow cytometry

The expression levels of cell surface markers on untreated and As₂O₃- or A23187-treated leukemic T-cell lines was analyzed by flow cytometry using either fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)-, allophycocyanin (APC)- or biotin-conjugated monoclonal antibodies (mAb): rat anti-mouse Thy-1.2/CD90.2 (clone 53-2.1), anti-CD45 (clone 2D1), anti-B220/CD45R (clone RA3-6B2), anti-mouse and human CD69 (clone H1.2 F3 and FN50), anti-mouse and human Fas (clone Jo2 and DX2), anti-mouse and human FasL (clone MFL3 and NOK-1) and anti-HSP70 (clone SMC-103A) (all from eBioscience, CliniSciences, Montrouge, France), and rat IgG2a, mouse IgG, mouse IgG1, and Armenian hamster IgG1 as the isotype control (eBiosciences). Use of mAb to mouse and human Fcγ receptor (PharMingen, BD Bioscience, San Jose, CA) avoided non-specific antibody binding.

The subcellular localization of B220/CD45R molecules was determined by imaging flow cytometry, following the protocol supplied by the manufacturer (Amnis Corp., Seattle, WA). Briefly, cells (1×10^6) stained with PE-conjugated anti-B220/CD45R mAbs and DAPI were run on an ImageStream apparatus (ImagoSeine, Institut Jacques Monod, CNRS-Université Paris Diderot, France). At least 10,000 images were collected per sample at 40× or 60× magnification, and analyzed using IDEAS image-analysis software (Amnis Corp.).

Cell proliferation, cell death and caspase activation assay

Total cell numbers in untreated and As₂O₃-treated groups were determined by flow cytometry by acquiring events for a fixed time period of 1 min. As₂O₃- and Calcium ionophore-induced cell death was analyzed by propidium iodide (PI) (Invitrogen) staining, and flow cytometry. Among PI⁺ cells, to discriminate between apoptotic and necrotic cells, the cells were stained using either FITC-conjugated Annexin V (PharMingen) or CaspaTag Caspase 8 or Caspase 9 In situ Assay Kit, Fluorescein according to the manufacturer's instructions (Chemicon, Temecula, CA). Annexin V staining and the levels of active caspase-8 and caspase-9 were measured by flow cytometry.

Analysis of reduced glutathione content and O₂⁻ production
GSH content and O₂⁻ production in T-cell lines treated or not with As₂O₃ were measured by flow cytometry

using 100 nM CellTracker probe CMFDA and 5 μM DHE probes, respectively, following the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, OR).

B220/CD45R mRNA quantification by RT-PCR

Total RNA was extracted from 5×10^6 leukemic T cells treated or not with As₂O₃ using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions and was used to generate cDNA utilizing oligo(dT) primer and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR were conducted for 25 cycles with the following primer pairs: B220/CD45R forward primer (5'-CAC ATA TCA TCC AGG TGT GTT ATC C-3') and reverse primer (5'-GTC CTC TCC CCT GGC ACA CCT G-3'); β-actin forward primer (5'-ATC GTG GGC CGC CCT AGG CAC-3') and reverse primer (5'-TGG CCT TAG GGT TCA GAG GGG C-3'). Semi-quantitative determination (ImageJ densitometric analysis software program) of B220 cDNA, present in each of the various samples, was normalized with respect to the concentration of internal control cDNA (β-actin) detected in the same sample, and B220/β-actin cDNA ratios were calculated.

Quantitative measurement of NF-κB activation

Nuclear extracts were prepared from 8×10^6 leukemic T cells treated or not with As₂O₃. The protein from nuclear extracts was quantified by the Bradford method (Bio-Rad, France). An equal amount of nuclear extract (5 μg) was assayed for NF-κB p50 activity using a TransAm NFκB p50 Transcription Factor Assay Kit according to the manufacturer's recommendations (ActiveMotif, Rixensart, Belgium).

Statistical analyses

Data are reported as fluorescence means ± SE. Significant differences between sample means were determined using the Student *t* test. Statistical significance was accepted at $P \leq 0.05$.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. (A) Cell morphology of As₂O₃-treated T-cell lines. APL-derived NB4 cells as well as EL-4, BW5147, L1210, Jurkat, CD45-deficient Jurkat variant (J45.01) and HPB-ALL T-cell lines were treated for 24 h with As₂O₃ in doses ranging from 1 to 20 μM. Cells were then analyzed by flow cytometry with respect to size (FSC) and granularity (SSC). Regions R1 and R2 identified on a FSC vs. SSC dot plot encompassed cells with FSC^{int/low}SSC^{high} and FSC^{high}SSC^{low}, respectively. At least 20,000 events were analyzed for each sample. FSC vs. SSC dot plots on murine EL-4 cells and human Jurkat cells are representative of more than 10 independent experiments. (B) Basal level of CD45 plasma membrane expression. Jurkat (■) and CD45-deficient Jurkat variant (J45.01) (□) cells were stained with PE-conjugated anti-CD45 mAb (clone 2D1) or PE-conjugated rat IgG2a isotype control, and then analyzed by flow cytometry. (C) B220 mRNA expression in As₂O₃-treated T-cell lines. RT-PCR analysis were performed to assess the levels of B220 mRNA in EL-4 and

BW5147 T cells cultured in the presence or absence of 1, 2 and 4 μM As_2O_3 for 3, 6 and 9 h. Results are representative of two other experiments.

Additional file 2: Figure S2. (A) Constitutive B220/CD45R cell surface expression on CD90^+ L1210 T cells. Cells were labeled with APC-conjugated anti-CD90 and PE-conjugated anti-B220/CD45R mAbs, or fluorescent isotype control, and then analyzed by flow cytometry. (B) B220 expression on As_2O_3 -treated cells. L1210 T cells were treated without or with As_2O_3 for 24 h in doses ranging from 1 to 20 μM . L1210 cells were then stained with PE-conjugated anti-B220/CD45R mAb or PE-conjugated rat IgG2a isotype control, and further analyzed by flow cytometry with respect to size (FSC) versus granulosity (SSC) and B220 expression. FSC vs. SSC dot plots were used to define gates R1 and R2 with $\text{FSC}^{\text{int/low}}\text{SSC}^{\text{high}}$ and $\text{FSC}^{\text{high}}\text{SSC}^{\text{low}}$, respectively. B220 histograms were then gated in R1 and R2 to determine the percentages of cells expressing B220 ($n=10$ independent experiments). At least 20,000 events were analyzed for each sample. (C) HSP70 induction on As_2O_3 -treated cells. L1210 T cells stained with anti-B220 and anti-HSP70 antibodies were analyzed by flow cytometry as described in Figure 3B. (D) FasL induction on Ca^{2+} ionophore treated cells. Histograms obtained with PE-conjugated Armenian hamster (clone MFL3) anti-FasL mAb (open histogram) are overlaid on histograms obtained with PE-conjugated Armenian hamster isotype control (shaded histogram) ($n=3$ independent experiments). At least 20,000 events were analyzed for each sample.

Additional file 3: Figure S3. Duration of B220/CD45R membrane expression upon As_2O_3 treatment. EL-4 and Jurkat T cells were cultured in the absence or in the presence of 1, 2, 4 or 8 μM As_2O_3 for 24 h. Then, cells were extensively washed with PBS to eliminate all traces of As_2O_3 , and cultured for 9 additional days. Expression of B220 was measured by flow cytometry at the time of As_2O_3 removal (referred to as day 0) and 1 to 9 days after As_2O_3 was removed. At least 20,000 events were analyzed for each sample. Dot plots of FSC vs. SSC on 8 μM As_2O_3 -treated EL-4 and Jurkat cells are representative of more than 3 independent experiments. Graphs report the percentages of B220^+ EL-4 or B220^+ Jurkat cells at the indicated time-points and concentrations of As_2O_3 , with the same isotype control labelling as in Figure 3.

Abbreviations

APL: Acute promyelocytic leukemia; AQP9: Aquaglyceroporin-9; As_2O_3 : Arsenic trioxide; DN: Double negative; FasL: Fas ligand; FSC: Forward scatter; EC_{50} : Half maximal effective concentration; IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration; HSP70: Heat shock protein-70; mAb: Monoclonal antibody; NF- κ B: Nuclear factor-kappa B; PI: Propidium iodide; ROS: Reactive oxygen species; GSH: Reduced glutathione; SSC: Side scatter; O_2^- : Superoxide anion radical; MFI: Mean fluorescence intensity.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Authors' contributions

PB and MB conceived and designed the experiments; MB and AM performed the experiments; MB, AM and PB analyzed the data; PB wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr Colette Kanellopoulos-Langevin (Centre for Inflammation Research, INSERM U699, Hôpital Bichat, Paris, France) for helpful discussions and for critical review of the manuscript. This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-07BLAN0089-02).

Author details

¹Institut Jacques Monod, CNRS, Université Paris Diderot, Paris, France.
²INSERM U1012, Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, Orsay, France.
³INSERM U757, Université Paris-Sud, Orsay, France.

Received: 16 January 2014 Accepted: 6 November 2014
Published: 19 November 2014

References

- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY: **Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients.** *Blood* 1997, **89**:3354–3360.
- Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP Jr: **Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide.** *N Engl J Med* 1998, **339**:1341–1348.
- Niu C, Yan H, Yu T, Sun HP, Liu JX, Li XS, Wu W, Zhang FQ, Chen Y, Zhou L, Li JM, Zeng XY, Yang RR, Yuan MM, Ren MY, Gu FY, Cao Q, Gu BW, Su XY, Chen GQ, Xiong SM, Zhang TD, Waxman S, Wang ZY, Chen Z, Hu J, Shen ZX, Chen SJ: **Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients.** *Blood* 1999, **94**:3315–3324.
- Lallemant-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, de The H: **Curing APL through PML/RARA degradation by As_2O_3 .** *Trends Mol Med* 2012, **18**:36–42.
- Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S: **Mechanisms of action of arsenic trioxide.** *Cancer Res* 2002, **62**:3893–3903.
- Lallemant-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, de The H: **Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:547–555.
- Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, Hay RT: **RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:538–546.
- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Naoe T, Kitamura K, Miller W, Waxman S, Wang ZY, de The H, Chen SJ, Chen Z: **Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells.** *Blood* 1997, **89**:3345–3353.
- Yang CH, Kuo ML, Chen JC, Chen YC: **Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells.** *Br J Cancer* 1999, **81**:796–799.
- Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y: **Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system.** *Blood* 1999, **93**:268–277.
- Chou WC, Jie C, Kennedy AA, Jones RJ, Trush MA, Dang CV: **Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:4578–4583.
- Dilda PJ, Hogg PJ: **Arsenical-based cancer drugs.** *Cancer Treat Rev* 2007, **33**:542–564.
- Bobé P, Bonardelle D, Benihoud K, Opolon P, Chelbi-Alix MK: **Arsenic trioxide: a promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice.** *Blood* 2006, **108**:3967–3975.
- Le Gall SM, Legrand J, Benbija M, Safya H, Benihoud K, Kanellopoulos JM, Bobé P: **Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice.** *PLoS One* 2012, **7**:e52161.
- Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR: **Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis.** *Eur J Immunol* 1998, **28**:540–547.
- Bleesing JJ, Morrow MR, Uzel G, Fleisher TA: **Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis.** *Cell Immunol* 2001, **213**:72–81.
- Hermiston ML, Xu Z, Weiss A: **CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells.** *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:107–137.
- Holmes N: **CD45: all is not yet crystal clear.** *Immunology* 2006, **117**:145–155.
- Rhee I, Veillette A: **Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity.** *Nat Immunol* 2012, **13**:439–447.
- Klaus SJ, Sidorenko SP, Clark EA: **CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes.** *J Immunol* 1996, **156**:2743–2753.
- Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG: **Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death.** *J Immunol* 2006, **176**:778–789.

22. Clark MC, Baum LG: T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 2012, **1253**:58–67.
23. Davison K, Mann KK, Waxman S, Miller WH Jr: JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 2004, **103**:3496–3502.
24. Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P: Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 2003, **278**:37832–37839.
25. Pelicano H, Carney D, Huang P: ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004, **7**:97–110.
26. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD: A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 1995, **61**:272–279.
27. Stangl S, Gehrmann M, Riegger J, Kuhs K, Riederer I, Sievert W, Hube K, Mocikat R, Dressel R, Kremmer E, Pockley AG, Friedrich L, Vigh L, Skerra A, Multhoff G: Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:733–738.
28. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F: CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005, **26**:136–140.
29. McCafferty-Grad J, Bahlis NJ, Krett N, Aguilar TM, Reis I, Lee KP, Boise LH: Arsenic trioxide uses caspase-dependent and caspase-independent death pathways in myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 2003, **2**:1155–1164.
30. Scholz C, Wieder T, Starck L, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT: Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. *Oncogene* 2005, **24**:1904–1913.
31. Perkins ND: The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012, **12**:121–132.
32. El-Sabban ME, Nasr R, Dbaibo G, Hermine O, Abboushi N, Quignon F, Ameisen JC, Bex F, de The H, Bazarbachi A: Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation. *Blood* 2000, **96**:2849–2855.
33. Bornhauser BC, Bonapace L, Lindholm D, Martinez R, Cario G, Schrappe M, Niggli FK, Schafer BW, Bourquin JP: Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway. *Blood* 2007, **110**:2084–2091.
34. Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, Zachariou A, Lopez J, MacFarlane M, Cain K, Meier P: The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* 2011, **43**:432–448.
35. Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP: ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-Selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 2009, **20**:1785–1794.
36. Zhu XH, Shen YL, Jing YK, Cai X, Jia PM, Huang Y, Tang W, Shi GY, Sun YP, Dai J, Wang ZY, Chen SJ, Zhang TD, Waxman S, Chen Z, Chen GQ: Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**:772–778.
37. Michel L, Dupuy A, Jean-Louis F, Sors A, Poupon J, Viguier M, Musette P, Dubertret L, Degos L, Dombret H, Bachelez H: Arsenic trioxide induces apoptosis of cutaneous T cell lymphoma cells: evidence for a partially caspase-independent pathway and potentiation by ascorbic acid (vitamin C). *J Invest Dermatol* 2003, **121**:881–893.
38. Bazarbachi A, El-Sabban ME, Nasr R, Quignon F, Awaraji C, Kersual J, Dianoux L, Zermati Y, Haidar JH, Hermine O, de The H: Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells. *Blood* 1999, **93**:278–283.
39. Chang J, Voorhees P, Kolesar J, Ahuja H, Sanchez F, Rodriguez G, Kim K, Wernli J, Bailey H, Kahl B: Phase II study of arsenic trioxide and ascorbic acid for relapsed or refractory lymphoid malignancies: a Wisconsin Oncology Network study. *Hematol Oncol* 2009, **27**:11–16.
40. Leung J, Pang A, Yuen WH, Kwong YL, Tse EW: Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood* 2007, **109**:740–746.
41. Gao L, Gao Y, Li X, Howell P, Kumar R, Su X, Vlassov AV, Piazza GA, Riker AI, Sun D, Xi Y: Aquaporins mediate the chemoresistance of human melanoma cells to arsenite. *Mol Oncol* 2012, **6**:81–87.
42. Renno T, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR: Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J Exp Med* 1996, **183**:431–437.
43. Brooks WP, Lynes MA: Effects of hemizygous CD45 expression in the autoimmune Fas(gld/gld) syndrome. *Cell Immunol* 2001, **212**:24–34.
44. Sherman M, Multhoff G: Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1113**:192–201.
45. Takayama S, Reed JC, Homma S: Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003, **22**:9041–9047.
46. Beere HM: "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004, **117**:2641–2651.
47. Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G: Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005, **65**:5238–5247.
48. Suto R, Srivastava PK: A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995, **269**:1585–1588.
49. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000, **6**:435–442.

doi:10.1186/1476-4598-13-251

Cite this article as: Benbija et al.: Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface. *Molecular Cancer* 2014 **13**:251.

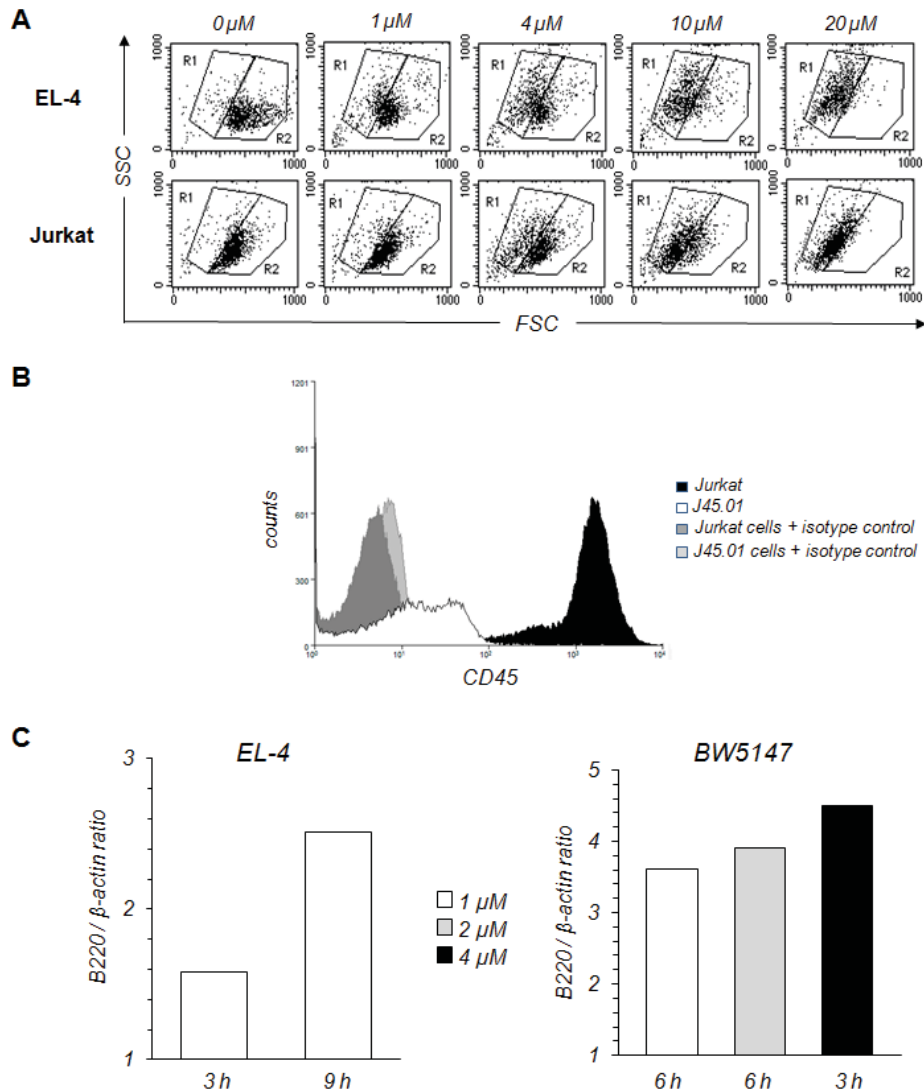
Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

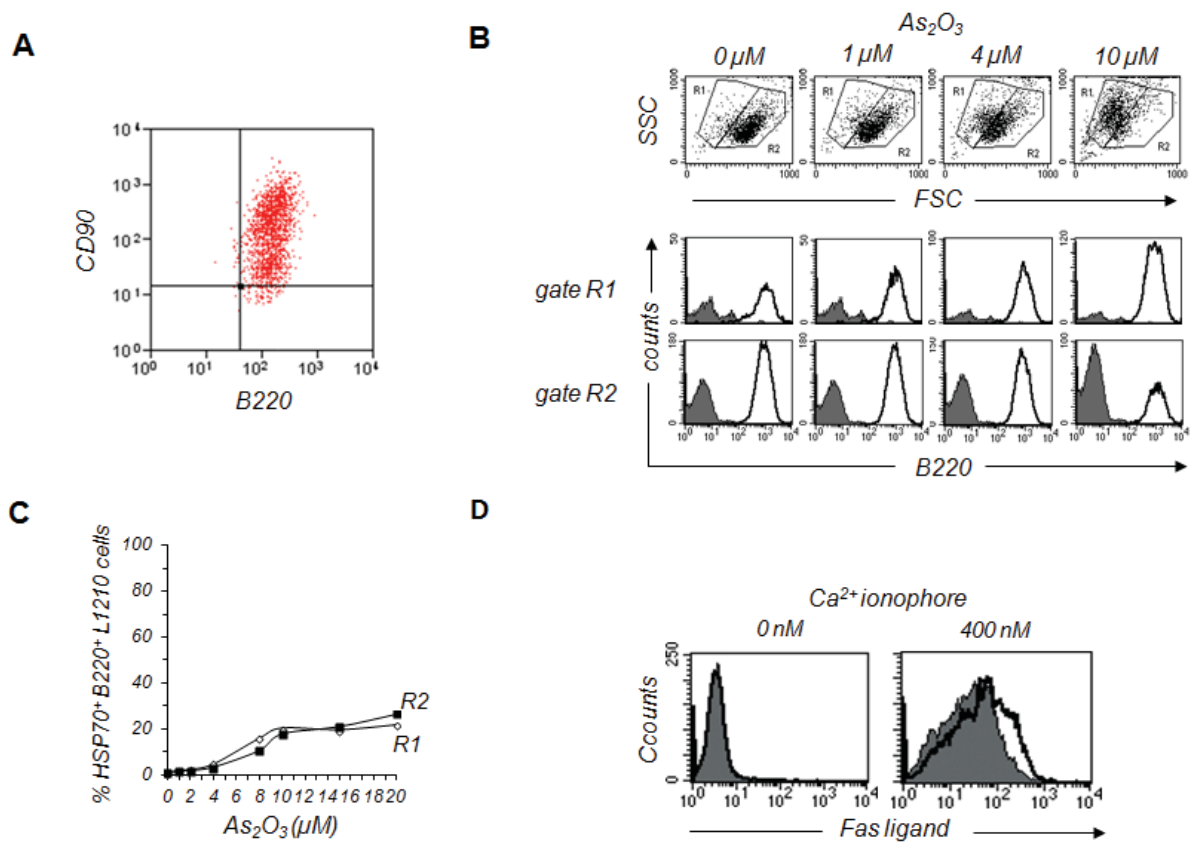


.1.2 Figures supplémentaires



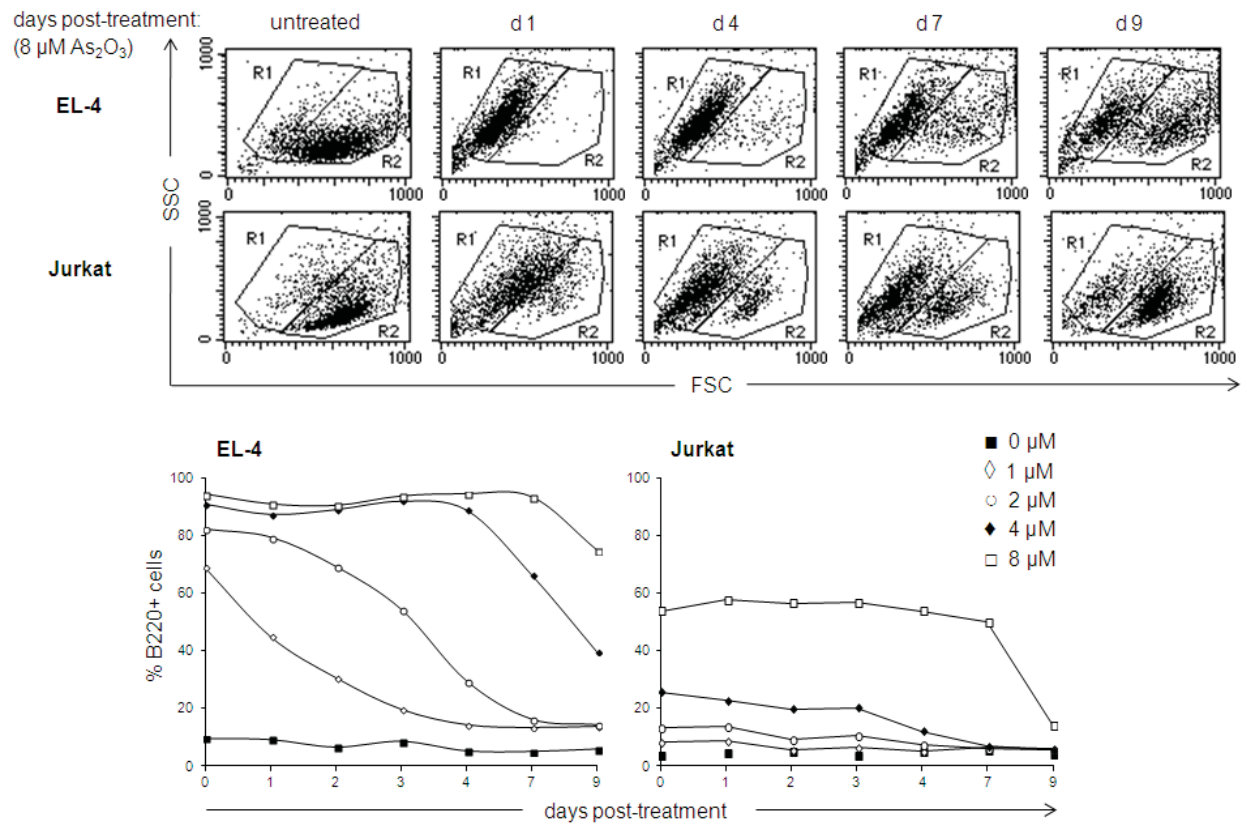
Supplementary Figure 1

Figure S1: (A) Cell morphology of As_2O_3 -treated T-cell lines. APL-derived NB4 cells as well as EL-4, BW5147, L1210, Jurkat, CD45-deficient Jurkat variant (J45.01) and HPB-ALL T-cell lines were treated for 24 h with As_2O_3 in doses ranging from 1 to 20 μ M. Cells were then analyzed by flow cytometry with respect to size (FSC) and granularity (SSC). Regions R1 and R2 identified on a FSC vs. SSC dot plot encompassed cells with $FSC^{int/low}SSC^{high}$ and $FSC^{high}SSC^{low}$, respectively. At least 20,000 events were analyzed for each sample. FSC vs. SSC dot plots on murine EL-4 cells and human Jurkat cells are representative of more than 10 independent experiments. (B) Basal level of CD45 plasma membrane expression. Jurkat (■) and CD45-deficient Jurkat variant (J45.01) (□) cells were stained with PE-conjugated anti-CD45 mAb (clone 2D1) or PE-conjugated rat IgG2a isotype control, and then analyzed by flow cytometry. (C) B220 mRNA expression in As_2O_3 -treated T-cell lines. RT-PCR analysis were performed to assess the levels of B220 mRNA in EL-4 and BW5147 T cells cultured in the presence or absence of 1, 2 and 4 μ M As_2O_3 for 3, 6 and 9 h. Results are representative of two other experiments.



Supplementary Figure 2

Figure S2: (A) Constitutive B220/CD45R cell surface expression on CD90⁺ L1210 T cells. Cells were labeled with APC-conjugated anti-CD90 and PE-conjugated anti-B220/CD45R mAbs, or fluorescent isotype control, and then analyzed by flow cytometry. (B) B220 expression on As₂O₃-treated cells. L1210 T cells were treated without or with As₂O₃ for 24 h in doses ranging from 1 to 20 μM . L1210 cells were then stained with PE-conjugated anti-B220/CD45R mAb or PE-conjugated rat IgG2a isotype control, and further analyzed by flow cytometry with respect to size (FSC) versus granularity (SSC) and B220 expression. FSC vs. SSC dot plots were used to define gates R1 and R2 with FSC^{int/low}SSC^{high} and FSC^{high}SSC^{low}, respectively. B220 histograms were then gated in R1 and R2 to determine the percentages of cells expressing B220 ($n = 10$ independent experiments). At least 20,000 events were analyzed for each sample. (C) HSP70 induction on As₂O₃-treated cells. L1210 T cells stained with anti-B220 and anti-HSP70 antibodies were analyzed by flow cytometry as described in Figure 3B. (D) FasL induction on Ca²⁺ ionophore treated cells. Histograms obtained with PE-conjugated Armenian hamster (clone MFL3) anti-FasL mAb (open histogram) are overlaid on histograms obtained with PE-conjugated Armenian hamster isotype control (shaded histogram) ($n = 3$ independent experiments). At least 20,000 events were analyzed for each sample.



Supplementary Figure 3

Figure S3: Duration of B220/CD45R membrane expression upon As_2O_3 treatment. EL-4 and Jurkat T cells were cultured in the absence or in the presence of 1, 2, 4 or 8 μM As_2O_3 for 24 h. Then, cells were extensively washed with PBS to eliminate all traces of As_2O_3 , and cultured for 9 additional days. Expression of B220 was measured by flow cytometry at the time of As_2O_3 removal (referred to as day 0) and 1 to 9 days after As_2O_3 was removed. At least 20,000 events were analyzed for each sample. Dot plots of FSC vs. SSC on 8 μM As_2O_3 -treated EL-4 and Jurkat cells are representative of more than 3 independent experiments. Graphs report the percentages of B220⁺ EL-4 or B220⁺ Jurkat cells at the indicated time-points and concentrations of As_2O_3 , with the same isotype control labelling as in Figure 3.

.II Calcium pyrophosphate dihydrate crystals induce IL-1beta production by monocytes through ATP release- and ROS production-dependent pathways – involvement of potassium efflux

L. Campillo-Gimenez, M. Renaud, P. Gras x, F. Renaudin, A. Mellouk, P. Bobe k, C. Combes, M. Cohen-Solal, F. Liote, H.-K. Ea.

Osteoarthritis and Cartilage, 2016

533

CALCIUM PYROPHOSPHATE DIHYDRATE CRYSTALS INDUCE IL-1BETA PRODUCTION BY MONOCYTES THROUGH ATP RELEASE- AND ROS PRODUCTION-DEPENDENT PATHWAYS – INVOLVEMENT OF POTASSIUM EFFLUX

L. Campillo-Gimenez †‡, M. Renaud †‡, P. Gras §, F. Renaudin †‡, A. Mellouk ¶¶, P. Bobe ¶¶, C. Combes §, M. Cohen-Solal †‡, F. Liote †#, H.-K. Ea †#. †INSERM UMR1132, Paris, France; ‡Paris Diderot Univ., Paris, France; §ENSIACET, CIRIMAT, INPT-UPS-CNRS, Toulouse, France; ¶INSERM UMR5757, Orsay, France; ¶Paris Sud Univ., Orsay, France; #AP-HP, Lariboisière Hosp., Rheumatology Dept., Paris, France

Purpose: Osteoarthritis (OA) is the most common adult rheumatic disease characterized by cartilage degradation, synovial inflammation and subchondral bone remodeling. Risk factors associated with OA are age, genetic, mechanical overload and presence of calcium-containing microcrystals. Calcium pyrophosphate crystals including monoclinic and triclinic dihydrate phases (m- and t-CPPD) are found in 40% of end-stage OA patients. *In vivo*, injection of CCP crystals into rabbit knees worsens surgery-induced OA. *In vitro*, CPP crystals display catabolic and pro-inflammatory effects through stimulation of interleukin (IL)-1 β production. IL-1 β secretion occurs after its maturation by caspase-1 which is activated by NLRP3 inflammasome. NLRP3 inflammasome can be stimulated by potassium (K⁺) efflux, reactive oxygen species (ROS) generation, lysosomal or mitochondrial alterations. In this study we aimed to decipher how CPP crystals initiate IL-1 β production.

Methods: Four types of CPP crystals were obtained *in vitro*: m-CPPD, t-CPPD, m-CPP tetrathylate (m-CPPT β) crystals, and amorphous CPP (a-CPP) phase [1]. The effects of CPP crystals and monosodium urate (MSU) crystals - used as control - were assessed in human THP-1 cell line and bone marrow-derived monocytes (BMDM) from wild type (wt) and P2X7 receptor knock out (p2x7r^{-/-}) mice. Cells were primed before stimulation with crystals in presence or absence of K⁺-enriched medium (KCl 50mM) or ROS scavenger (N-acetyl-L-cystein 50mM). IL-1 β and extracellular ATP (ATP_e) concentrations were quantified in cell

culture supernatants by ELISA and chemiluminescence respectively; NLRP3 expression from cell lysates by western blot. Expression of inflammatory mediator genes was analyzed by qPCR. ROS production and mitochondrial membrane potential were evaluated by flow cytometry, using fluorescent probes (CellRox® and JC-1 respectively).

Results: We showed that m-, t-CPPD and MSU crystals differentially induced NLRP3 activation, IL-1 β secretion and IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , COX2 gene expression (m-CPPD > MSU > t-CPPD) while a-CPP and m-CPPT β crystals had no effect on THP-1 cells and wt BMDM; IL-1 β production was not correlated with CPP crystal specific surface area. Then, we assessed the mechanisms of CPP crystal-induced IL-1 β production. First, we showed that m- or t-CPPD-induced IL-1 β secretion was completely abrogated when K⁺ efflux or intracellular ROS were inhibited. Second, we demonstrated an early decrease in mitochondrial membrane potential following crystal stimulation combined with a *de novo* ROS generation. These two latter effects were inhibited when K⁺ efflux was blocked. Finally, we found that m- and t-CPPD crystals brought on an ATP release and that IL-1 β production was partially inhibited by oxidized ATP. However, although ATP_e can trigger K⁺ efflux through P2X7 receptor opening, crystal-mediated IL-1 β production was similar between wt and p2x7r^{-/-} BMDM.

Conclusions: CPP crystals had different inflammatory properties; m-CPPD crystals being the most potent one. IL-1 β production triggered by CPPD crystals occurred through ATP release and mitochondrial disruption/ROS production. Interestingly, K⁺ efflux could be the initial signal of CPPD-induced IL-1 β maturation, independently of P2X7 receptor involvement. These results highlighted a new molecular pathway of crystal-dependant OA inflammation.

[1] P. Gras et al, Eur. J. Inorg. Chem., 2013

Références Bibliographiques

- 1 Moulton, V. R. *et al.* Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med* **23**, 615-635, doi:10.1016/j.molmed.2017.05.006 (2017).
- 2 Cowan, J. E., Jenkinson, W. E. & Anderson, G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant gammadelta T cells, and invariant NKT cells: what we learn from intrathymic migration. *Eur J Immunol* **45**, 652-660, doi:10.1002/eji.201445108 (2015).
- 3 Bobé, P., Bonardelle, D., Benihoud, K., Opolon, P. & Chelbi-Alix, M. K. Arsenic trioxide: A promising novel therapeutic agent for lymphoproliferative and autoimmune syndromes in MRL/lpr mice. *Blood* **108**, 3967-3975, doi:10.1182/blood-2006-04-020610 (2006).
- 4 Schatton, T., Scolyer, R. A., Thompson, J. F. & Mihm, M. C., Jr. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol Biol* **1102**, 287-324, doi:10.1007/978-1-62703-727-3_16 (2014).
- 5 Bakdash, G., Sittig, S. P., van Dijk, T., Figdor, C. G. & de Vries, I. J. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol* **4**, 53, doi:10.3389/fimmu.2013.00053 (2013).
- 6 Ma, C. S., Hodgkin, P. D. & Tangye, S. G. Automatic generation of lymphocyte heterogeneity: Division-dependent changes in the expression of CD27, CCR7 and CD45 by activated human naive CD4+ T cells are independently regulated. *Immunol Cell Biol* **82**, 67-74, doi:10.1046/j.0818-9641.2003.01206.x (2004).
- 7 Safya, H. *et al.* Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage. *Front Immunol* **9**, 360, doi:10.3389/fimmu.2018.00360 (2018).
- 8 Janeway, C. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th edn, (Garland Science, 2005).
- 9 Baaten, B. J., Tinoco, R., Chen, A. T. & Bradley, L. M. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front Immunol* **3**, 23, doi:10.3389/fimmu.2012.00023 (2012).
- 10 Takada, K., Kondo, K. & Takahama, Y. Generation of Peptides That Promote Positive Selection in the Thymus. *J Immunol* **198**, 2215-2222, doi:10.4049/jimmunol.1601862 (2017).
- 11 DuPage, M. & Bluestone, J. A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* **16**, 149-163, doi:10.1038/nri.2015.18 (2016).
- 12 Sluyter, R. & Stokes, L. Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. *Recent Pat DNA Gene Seq* **5**, 41-54 (2011).
- 13 Lu, L., Barbi, J. & Pan, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol*, doi:10.1038/nri.2017.75 (2017).
- 14 Mariathasan, S. & Monack, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**, 31-40, doi:10.1038/nri1997 (2007).

- 15 Cekic, C. & Linden, J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **16**, 177-192, doi:10.1038/nri.2016.4 (2016).
- 16 Moran, A. E. & Hogquist, K. A. T-cell receptor affinity in thymic development. *Immunology* **135**, 261-267, doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03547.x (2012).
- 17 Bouillet, P. & O'Reilly, L. A. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **9**, 514-519, doi:10.1038/nri2570 (2009).
- 18 Amsen, D., Antov, A. & Flavell, R. A. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **9**, 116-124, doi:10.1038/nri2488 (2009).
- 19 Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* **6**, 127-135, doi:10.1038/nri1781 (2006).
- 20 Millar, D. G. & Ohashi, P. S. Central tolerance: what you see is what you don't get! *Nat Immunol* **17**, 115-116, doi:10.1038/ni.3373 (2016).
- 21 Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322, doi:10.1038/nri798 (2002).
- 22 Hattori, M. & Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**, 207-212, doi:10.1038/nature11010 (2012).
- 23 Fields, R. D. & Burnstock, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* **7**, 423-436, doi:10.1038/nrn1928 (2006).
- 24 Lambert, P. B. Identification of thymic-dependent lymphocytes. *Lancet* **2**, 1321-1322 (1971).
- 25 Bleul, C. C. & Boehm, T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* **30**, 3371-3379, doi:10.1002/1521-4141(2000012)30:12<3371::AID-IMMU3371>3.0.CO;2-L (2000).
- 26 Daley, S. R., Teh, C., Hu, D. Y., Strasser, A. & Gray, D. H. D. Cell death and thymic tolerance. *Immunol Rev* **277**, 9-20, doi:10.1111/imr.12532 (2017).
- 27 Capone, M., Romagnoli, P., Beermann, F., MacDonald, H. R. & van Meerwijk, J. P. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* **97**, 1336-1342 (2001).
- 28 Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D. & Glimcher, L. H. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* **383**, 81-85, doi:10.1038/383081a0 (1996).
- 29 Kondo, K., Takada, K. & Takahama, Y. Antigen processing and presentation in the thymus: implications for T cell repertoire selection. *Curr Opin Immunol* **46**, 53-57, doi:10.1016/j.coi.2017.03.014 (2017).
- 30 Wurbel, M. A. *et al.* Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* **98**, 2626-2632 (2001).
- 31 Liu, C. *et al.* The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymus. *Blood* **105**, 31-39, doi:10.1182/blood-2004-04-1369 (2005).

- 32 Ara, T. *et al.* A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* **170**, 4649-4655 (2003).
- 33 Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-176, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107 (2003).
- 34 Thompson, P. K. & Zuniga-Pflucker, J. C. On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Semin Immunol* **23**, 350-359, doi:10.1016/j.smim.2011.08.007 (2011).
- 35 Koch, U. *et al.* Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* **205**, 2515-2523, doi:10.1084/jem.20080829 (2008).
- 36 Anderson, G. & Takahama, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* **33**, 256-263, doi:10.1016/j.it.2012.03.005 (2012).
- 37 Yamasaki, S. & Saito, T. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol* **28**, 39-43, doi:10.1016/j.it.2006.11.006 (2007).
- 38 Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W. X., Cinalli, R. M. & Thompson, C. B. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* **3**, 932-939, doi:10.1038/ni834 (2002).
- 39 Bouillet, P. *et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* **415**, 922-926, doi:10.1038/415922a (2002).
- 40 Anderson, G., Owen, J. J., Moore, N. C. & Jenkinson, E. J. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Exp Med* **179**, 2027-2031 (1994).
- 41 Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L. & Shortman, K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**, 761-763, doi:10.1038/362761a0 (1993).
- 42 Donskoy, E. & Goldschneider, I. Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* **170**, 3514-3521 (2003).
- 43 Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-1401, doi:10.1126/science.1075958 (2002).
- 44 Dzierzak, E., Medvinsky, A. & de Bruijn, M. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today* **19**, 228-236 (1998).
- 45 Kurobe, H. *et al.* CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* **24**, 165-177, doi:10.1016/j.immuni.2005.12.011 (2006).
- 46 Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431-440 (2000).
- 47 Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **6**, 152-162, doi:10.1038/ni1160 (2005).
- 48 Vang, K. B. *et al.* Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development. *J Immunol* **184**, 4074-4077, doi:10.4049/jimmunol.0903933 (2010).

- 49 Isomura, I. *et al.* c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med* **206**, 3001-3014, doi:10.1084/jem.20091411 (2009).
- 50 Ruan, Q. *et al.* Development of Foxp3(+) regulatory T cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* **31**, 932-940, doi:10.1016/j.immuni.2009.10.006 (2009).
- 51 Teh, P. P., Vasanthakumar, A. & Kallies, A. Development and Function of Effector Regulatory T Cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* **136**, 155-174, doi:10.1016/bs.pmbts.2015.08.005 (2015).
- 52 Spence, P. J. & Green, E. A. Foxp3+ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 973-978, doi:10.1073/pnas.0709071105 (2008).
- 53 Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**, 1142-1151, doi:10.1038/ni1263 (2005).
- 54 Bayer, A. L., Lee, J. Y., de la Barrera, A., Surh, C. D. & Malek, T. R. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* **181**, 225-234 (2008).
- 55 Vang, K. B. *et al.* IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* **181**, 3285-3290 (2008).
- 56 Liu, Y. *et al.* A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **9**, 632-640, doi:10.1038/ni.1607 (2008).
- 57 Richards, D. M. *et al.* Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue. *Prog Mol Biol Transl Sci* **136**, 175-205, doi:10.1016/bs.pmbts.2015.07.014 (2015).
- 58 Wei, D. G. *et al.* Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* **202**, 239-248, doi:10.1084/jem.20050413 (2005).
- 59 Watarai, H. *et al.* Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. *PLoS Biol* **10**, e1001255, doi:10.1371/journal.pbio.1001255 (2012).
- 60 White, A. J. *et al.* An essential role for medullary thymic epithelial cells during the intrathymic development of invariant NKT cells. *J Immunol* **192**, 2659-2666, doi:10.4049/jimmunol.1303057 (2014).
- 61 Pitt, L. A., Hubert, F. X., Scott, H. S., Godfrey, D. I. & Berzins, S. P. NKT cell development in the absence of the autoimmune regulator gene (Aire). *Eur J Immunol* **38**, 2689-2696, doi:10.1002/eji.200838553 (2008).
- 62 Zarin, P., Chen, E. L., In, T. S., Anderson, M. K. & Zuniga-Pflucker, J. C. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cell Immunol* **296**, 70-75, doi:10.1016/j.cellimm.2015.03.007 (2015).
- 63 Prinz, I., Silva-Santos, B. & Pennington, D. J. Functional development of gammadelta T cells. *Eur J Immunol* **43**, 1988-1994, doi:10.1002/eji.201343759 (2013).
- 64 Silva-Santos, B., Pennington, D. J. & Hayday, A. C. Lymphotoxin-mediated regulation of gammadelta cell differentiation by alphabeta T cell progenitors. *Science* **307**, 925-928, doi:10.1126/science.1103978 (2005).

- 65 Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., von Boehmer, H. & Zuniga-Pflucker, J. C. Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* **25**, 105-116, doi:10.1016/j.immuni.2006.05.010 (2006).
- 66 Kwong, B. & Lazarevic, V. T-bet orchestrates CD8alphaalpha IEL differentiation. *Immunity* **41**, 169-171, doi:10.1016/j.immuni.2014.08.003 (2014).
- 67 Park, Y., Moon, S. J. & Lee, S. W. Lineage re-commitment of CD4CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes in the gut. *BMB Rep* **49**, 11-17, doi:10.5483/BMBRep.2016.49.1.242 (2016).
- 68 Ruscher, R., Kummer, R. L., Lee, Y. J., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes arise from two main thymic precursors. *Nat Immunol* **18**, 771-779, doi:10.1038/ni.3751 (2017).
- 69 Wang, H. & Hogquist, K. A. How MAIT cells get their start. *Nat Immunol* **17**, 1238-1240, doi:10.1038/ni.3584 (2016).
- 70 Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* **23**, 127-159, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628 (2005).
- 71 Cahalan, M. D. & Parker, I. Imaging the choreography of lymphocyte trafficking and the immune response. *Curr Opin Immunol* **18**, 476-482, doi:10.1016/j.coi.2006.05.013 (2006).
- 72 Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I. & Cahalan, M. D. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* **296**, 1869-1873, doi:10.1126/science.1070051 (2002).
- 73 Vivien, L., Benoist, C. & Mathis, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* **13**, 763-768 (2001).
- 74 Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W. & Thompson, C. B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* **167**, 6869-6876 (2001).
- 75 Kerdiles, Y. M. *et al.* Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* **10**, 176-184, doi:10.1038/ni.1689 (2009).
- 76 Schwab, S. R. *et al.* Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* **309**, 1735-1739, doi:10.1126/science.1113640 (2005).
- 77 Blattman, J. N. *et al.* Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-664 (2002).
- 78 Moon, J. J. *et al.* Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* **27**, 203-213, doi:10.1016/j.immuni.2007.07.007 (2007).
- 79 Li, K. P. *et al.* Dying to protect: cell death and the control of T-cell homeostasis. *Immunol Rev* **277**, 21-43, doi:10.1111/imr.12538 (2017).
- 80 Bedoui, S., Heath, W. R. & Mueller, S. N. CD4(+) T-cell help amplifies innate signals for primary CD8(+) T-cell immunity. *Immunol Rev* **272**, 52-64, doi:10.1111/imr.12426 (2016).
- 81 Bonasio, R. & von Andrian, U. H. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **18**, 503-511, doi:10.1016/j.coi.2006.05.011 (2006).
- 82 Itano, A. A. *et al.* Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* **19**, 47-57 (2003).

- 83 Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M. & Germain, R. N. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**, 1873-1876, doi:10.1126/science.1071065 (2002).
- 84 Cemerski, S. & Shaw, A. Immune synapses in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* **18**, 298-304, doi:10.1016/j.coi.2006.03.011 (2006).
- 85 Molon, B. *et al.* T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* **6**, 465-471, doi:10.1038/ni1191 (2005).
- 86 Shiow, L. R. *et al.* CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* **440**, 540-544, doi:10.1038/nature04606 (2006).
- 87 Mayya, V. & Dustin, M. L. What Scales the T Cell Response? *Trends Immunol* **37**, 513-522, doi:10.1016/j.it.2016.06.005 (2016).
- 88 Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**, 161-168, doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010 (2011).
- 89 Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* **236**, 190-202, doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x (2010).
- 90 Miller, J. *et al.* Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res* **45**, 159-172, doi:10.1007/s12026-009-8097-6 (2009).
- 91 Kim, H. P., Imbert, J. & Leonard, W. J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 349-366, doi:10.1016/j.cytogfr.2006.07.003 (2006).
- 92 Waysbort, N., Russ, D., Chain, B. M. & Friedman, N. Coupled IL-2-dependent extracellular feedbacks govern two distinct consecutive phases of CD4 T cell activation. *J Immunol* **191**, 5822-5830, doi:10.4049/jimmunol.1301575 (2013).
- 93 Qureshi, O. S. *et al.* Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation. *J Biol Chem* **287**, 9429-9440, doi:10.1074/jbc.M111.304329 (2012).
- 94 Smith, C. M. *et al.* Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* **5**, 1143-1148, doi:10.1038/ni1129 (2004).
- 95 Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* **6**, 1182-1190, doi:10.1038/ni1275 (2005).
- 96 Halle, S., Halle, O. & Forster, R. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol* **38**, 432-443, doi:10.1016/j.it.2017.04.002 (2017).
- 97 Intlekofer, A. M. *et al.* Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* **6**, 1236-1244, doi:10.1038/ni1268 (2005).
- 98 Pearce, E. L. *et al.* Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041-1043, doi:10.1126/science.1090148 (2003).
- 99 Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12**, 749-761, doi:10.1038/nri3307 (2012).
- 100 Mackay, L. K. *et al.* T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* **43**, 1101-1111, doi:10.1016/j.immuni.2015.11.008 (2015).

- 101 Backer, R. A. *et al.* A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol* **15**, 1143-1151, doi:10.1038/ni.3027 (2014).
- 102 Graham, M. B., Braciale, V. L. & Braciale, T. J. Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *J Exp Med* **180**, 1273-1282 (1994).
- 103 Tian, Y., Sette, A. & Weiskopf, D. Cytotoxic CD4 T Cells: Differentiation, Function, and Application to Dengue Virus Infection. *Front Immunol* **7**, 531, doi:10.3389/fimmu.2016.00531 (2016).
- 104 Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front Immunol* **8**, 194, doi:10.3389/fimmu.2017.00194 (2017).
- 105 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- 106 Iezzi, G. *et al.* CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 876-881, doi:10.1073/pnas.0810769106 (2009).
- 107 Coutaz, M. *et al.* Notch regulates Th17 differentiation and controls trafficking of IL-17 and metabolic regulators within Th17 cells in a context-dependent manner. *Sci Rep* **6**, 39117, doi:10.1038/srep39117 (2016).
- 108 I, K. Y. *et al.* Activation of Adhesion GPCR EMR2/ADGRE2 Induces Macrophage Differentiation and Inflammatory Responses via Galpha16/Akt/MAPK/NF-kappaB Signaling Pathways. *Front Immunol* **8**, 373, doi:10.3389/fimmu.2017.00373 (2017).
- 109 Chen, W. *et al.* 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, doi:10.1084/jem.20030152 (2003).
- 110 Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* **25**, 455-471, doi:10.1016/j.immuni.2006.07.011 (2006).
- 111 Samon, J. B. *et al.* Notch1 and TGFbeta1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood* **112**, 1813-1821, doi:10.1182/blood-2008-03-144980 (2008).
- 112 Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A. & Murphy, K. M. Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int Immunol* **5**, 371-382 (1993).
- 113 Marchant, A. *et al.* Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. *J Immunol* **163**, 2249-2255 (1999).
- 114 Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669 (2000).
- 115 Rissoan, M. C. *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186 (1999).

- 116 Cella, M. *et al.* Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* **184**, 747-752 (1996).
- 117 Tsung, K., Meko, J. B., Peplinski, G. R., Tsung, Y. L. & Norton, J. A. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* **158**, 3359-3365 (1997).
- 118 Toellner, K. M. *et al.* T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med* **187**, 1193-1204 (1998).
- 119 Altare, F. *et al.* Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**, 1432-1435 (1998).
- 120 Min, B. *et al.* Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* **200**, 507-517, doi:10.1084/jem.20040590 (2004).
- 121 Pearce, E. J. *et al.* Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* **201**, 117-126, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00187.x (2004).
- 122 Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596 (1997).
- 123 Hasbold, J., Lyons, A. B., Kehry, M. R. & Hodgkin, P. D. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol* **28**, 1040-1051, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<1040::AID-IMMU1040>3.0.CO;2-9 (1998).
- 124 Lundgren, M. *et al.* Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* **19**, 1311-1315, doi:10.1002/eji.1830190724 (1989).
- 125 Sonoda, E. *et al.* Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med* **170**, 1415-1420 (1989).
- 126 Harriman, G. R., Kunimoto, D. Y. & Strober, W. IgA B cell differentiation. *Immunol Invest* **18**, 17-28 (1989).
- 127 Jego, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-234 (2003).
- 128 Yamaguchi, Y. *et al.* Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* **167**, 1737-1742 (1988).
- 129 Clayton, F. *et al.* Eosinophilic esophagitis in adults is associated with IgG4 and not mediated by IgE. *Gastroenterology* **147**, 602-609, doi:10.1053/j.gastro.2014.05.036 (2014).
- 130 Madden, K. B. *et al.* Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *J Immunol* **169**, 4417-4422 (2002).
- 131 Zhao, A. *et al.* Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol* **171**, 948-954 (2003).
- 132 Ouyang, W. *et al.* Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* **9**, 745-755 (1998).
- 133 Fields, P. E., Kim, S. T. & Flavell, R. A. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol* **169**, 647-650 (2002).

- 134 Ivanov, I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133, doi:10.1016/j.cell.2006.07.035 (2006).
- 135 Laan, M. *et al.* Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* **162**, 2347-2352 (1999).
- 136 Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203**, 2271-2279, doi:10.1084/jem.20061308 (2006).
- 137 Boniface, K. *et al.* Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN- γ -producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. *J Immunol* **185**, 679-687, doi:10.4049/jimmunol.1000366 (2010).
- 138 Stockinger, B. & Omenetti, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol* **17**, 535-544, doi:10.1038/nri.2017.50 (2017).
- 139 Hutloff, A. *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-266, doi:10.1038/16717 (1999).
- 140 McAdam, A. J. *et al.* Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* **165**, 5035-5040 (2000).
- 141 McAdam, A. J. *et al.* ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**, 102-105, doi:10.1038/35051107 (2001).
- 142 Coyle, A. J. *et al.* The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* **13**, 95-105 (2000).
- 143 Lohning, M. *et al.* Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* **197**, 181-193 (2003).
- 144 Wassink, L. *et al.* ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. *J Immunol* **173**, 1779-1786 (2004).
- 145 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141, doi:10.1038/ni1261 (2005).
- 146 Burmeister, Y. *et al.* ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* **180**, 774-782 (2008).
- 147 Ohshima, Y. *et al.* Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* **159**, 3838-3848 (1997).
- 148 Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X. & Croft, M. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. *Immunity* **22**, 621-631, doi:10.1016/j.immuni.2005.03.012 (2005).
- 149 Gramaglia, I., Weinberg, A. D., Lemon, M. & Croft, M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* **161**, 6510-6517 (1998).
- 150 Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N. & Croft, M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* **15**, 445-455 (2001).

- 151 Flynn, S., Toellner, K. M., Raykundalia, C., Goodall, M. & Lane, P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med* **188**, 297-304 (1998).
- 152 So, T., Song, J., Sugie, K., Altman, A. & Croft, M. Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3740-3745, doi:10.1073/pnas.0600205103 (2006).
- 153 Jenkins, S. J., Perona-Wright, G., Worsley, A. G., Ishii, N. & MacDonald, A. S. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol* **179**, 3515-3523 (2007).
- 154 Takeda, I. *et al.* Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* **172**, 3580-3589 (2004).
- 155 Ruby, C. E. *et al.* Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol* **183**, 4853-4857, doi:10.4049/jimmunol.0901112 (2009).
- 156 So, T. & Croft, M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *J Immunol* **179**, 1427-1430 (2007).
- 157 Plitas, G. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res* **4**, 721-725, doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0193 (2016).
- 158 Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-1265, doi:10.1084/jem.20062512 (2007).
- 159 Cao, X. *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635-646, doi:10.1016/j.immuni.2007.08.014 (2007).
- 160 Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* **8**, 191-197, doi:10.1038/ni1428 (2007).
- 161 Nedoszytko, B. *et al.* The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part I: Treg properties and functions. *Postepy Dermatol Alergol* **34**, 285-294, doi:10.5114/ada.2017.69305 (2017).
- 162 Wakkach, A. *et al.* Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* **18**, 605-617 (2003).
- 163 Raker, V. K., Domogalla, M. P. & Steinbrink, K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol* **6**, 569, doi:10.3389/fimmu.2015.00569 (2015).
- 164 Gleisner, M. A., Roseblatt, M., Fierro, J. A. & Bono, M. R. Delivery of alloantigens via apoptotic cells generates dendritic cells with an immature tolerogenic phenotype. *Transplant Proc* **43**, 2325-2333, doi:10.1016/j.transproceed.2011.06.007 (2011).
- 165 Annacker, O. *et al.* Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* **202**, 1051-1061, doi:10.1084/jem.20040662 (2005).
- 166 Ochando, J. C. *et al.* Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* **7**, 652-662, doi:10.1038/ni1333 (2006).
- 167 Liu, J. & Cao, X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun* **63**, 1-12, doi:10.1016/j.jaut.2015.07.011 (2015).

- 168 Henson, S. M. & Akbar, A. N. KLRG1--more than a marker for T cell senescence. *Age (Dordr)* **31**, 285-291, doi:10.1007/s11357-009-9100-9 (2009).
- 169 Obar, J. J. *et al.* Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* **187**, 4967-4978, doi:10.4049/jimmunol.1102335 (2011).
- 170 Kobayashi, T., Doff, B. L., Rearden, R. C., Leggatt, G. R. & Mattarollo, S. R. NKT cell-targeted vaccination plus anti-4-1BB antibody generates persistent CD8 T cell immunity against B cell lymphoma. *Oncoimmunology* **4**, e990793, doi:10.4161/2162402X.2014.990793 (2015).
- 171 Boulet, S., Daudelin, J. F. & Labrecque, N. IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8+ short-lived effector T cell differentiation. *J Immunol* **193**, 1847-1854, doi:10.4049/jimmunol.1302365 (2014).
- 172 Rutishauser, R. L. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **31**, 296-308, doi:10.1016/j.immuni.2009.05.014 (2009).
- 173 Gerlach, C. *et al.* The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity* **45**, 1270-1284, doi:10.1016/j.immuni.2016.10.018 (2016).
- 174 Olson, J. A., McDonald-Hyman, C., Jameson, S. C. & Hamilton, S. E. Effector-like CD8(+) T cells in the memory population mediate potent protective immunity. *Immunity* **38**, 1250-1260, doi:10.1016/j.immuni.2013.05.009 (2013).
- 175 Foy, S. P. *et al.* Poxvirus-based active immunotherapy synergizes with CTLA-4 blockade to increase survival in a murine tumor model by improving the magnitude and quality of cytotoxic T cells. *Cancer Immunol Immunother* **65**, 537-549, doi:10.1007/s00262-016-1816-7 (2016).
- 176 Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712, doi:10.1038/44385 (1999).
- 177 Jobe, O. *et al.* Immunization with radiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites induces liver cCD8alpha+DC that activate CD8+T cells against liver-stage malaria. *PLoS One* **4**, e5075, doi:10.1371/journal.pone.0005075 (2009).
- 178 Meraldi, V., Romero, J. F., Kensil, C. & Corradin, G. A strong CD8+ T cell response is elicited using the synthetic polypeptide from the C-terminus of the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei* together with the adjuvant QS-21: quantitative and phenotypic comparison with the vaccine model of irradiated sporozoites. *Vaccine* **23**, 2801-2812, doi:10.1016/j.vaccine.2004.10.044 (2005).
- 179 Ho, J. *et al.* A CD8+/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* **180**, 2573-2580 (2008).
- 180 Hamann, D. *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* **186**, 1407-1418 (1997).
- 181 Derhovanessian, E. *et al.* Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. *J Gen Virol* **92**, 2746-2756, doi:10.1099/vir.0.036004-0 (2011).

- 182 Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A. J. & Callan, M. F. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol* **175**, 5895-5903 (2005).
- 183 Mackay, L. K. *et al.* Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 7037-7042, doi:10.1073/pnas.1202288109 (2012).
- 184 Mackay, L. K. *et al.* Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* **352**, 459-463, doi:10.1126/science.aad2035 (2016).
- 185 Prasad, S. *et al.* The PD-1: PD-L1 pathway promotes development of brain-resident memory T cells following acute viral encephalitis. *J Neuroinflammation* **14**, 82, doi:10.1186/s12974-017-0860-3 (2017).
- 186 Catalfamo, M. *et al.* Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity* **20**, 219-230 (2004).
- 187 Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol* **14**, 509-513, doi:10.1038/ni.2568 (2013).
- 188 Schon, M. P. *et al.* Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* **162**, 6641-6649 (1999).
- 189 Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* **10**, 524-530, doi:10.1038/ni.1718 (2009).
- 190 Epardaud, M. *et al.* Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8+ T cells. *Cancer Res* **68**, 2972-2983, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0045 (2008).
- 191 Webb, J. R., Milne, K., Watson, P., Deleeuw, R. J. & Nelson, B. H. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **20**, 434-444, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1877 (2014).
- 192 Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* **15**, 486-499, doi:10.1038/nri3862 (2015).
- 193 Jiang, Y., Li, Y. & Zhu, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* **6**, e1792, doi:10.1038/cddis.2015.162 (2015).
- 194 Gupta, P. K. *et al.* CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* **11**, e1005177, doi:10.1371/journal.ppat.1005177 (2015).
- 195 Cullen, S. P. & Martin, S. J. Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer. *Semin Cell Dev Biol* **39**, 26-34, doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.012 (2015).
- 196 Xu, X. *et al.* Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat Immunol* **15**, 1152-1161, doi:10.1038/ni.3025 (2014).
- 197 Lenardo, M. J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**, 858-861, doi:10.1038/353858a0 (1991).
- 198 Vella, A. T., Dow, S., Potter, T. A., Kappler, J. & Marrack, P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3810-3815 (1998).

- 199 Bouillet, P. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735-1738 (1999).
- 200 Zheng, L., Li, J. & Lenardo, M. Restimulation-induced cell death: new medical and research perspectives. *Immunol Rev* **277**, 44-60, doi:10.1111/imr.12535 (2017).
- 201 Devadas, S. *et al.* Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* **25**, 237-247, doi:10.1016/j.immuni.2006.06.011 (2006).
- 202 Wojciechowski, S. *et al.* Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *J Exp Med* **204**, 1665-1675, doi:10.1084/jem.20070618 (2007).
- 203 Chougnet, C. A. *et al.* A major role for Bim in regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* **186**, 156-163, doi:10.4049/jimmunol.1001505 (2011).
- 204 Reckling, S. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 family member Bim promotes persistent infection and limits protective immunity. *Infect Immun* **76**, 1179-1185, doi:10.1128/IAI.01093-06 (2008).
- 205 Sionov, R. V., Vlahopoulos, S. A. & Granot, Z. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget* **6**, 23058-23134, doi:10.18632/oncotarget.5492 (2015).
- 206 Xiao, C. *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* **9**, 405-414, doi:10.1038/ni1575 (2008).
- 207 Rouquette-Jazdanian, A. K. *et al.* miR-155 Controls Lymphoproliferation in LAT Mutant Mice by Restraining T-Cell Apoptosis via SHIP-1/mTOR and PAK1/FOXO3/BIM Pathways. *PLoS One* **10**, e0131823, doi:10.1371/journal.pone.0131823 (2015).
- 208 Yao, S. *et al.* Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity* **39**, 833-845, doi:10.1016/j.immuni.2013.10.007 (2013).
- 209 Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C. & Cook, S. J. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* **278**, 18811-18816, doi:10.1074/jbc.M301010200 (2003).
- 210 Hubner, A., Barrett, T., Flavell, R. A. & Davis, R. J. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* **30**, 415-425, doi:10.1016/j.molcel.2008.03.025 (2008).
- 211 Erlacher, M. *et al.* Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med* **203**, 2939-2951, doi:10.1084/jem.20061552 (2006).
- 212 Labi, V. *et al.* Deregulated cell death and lymphocyte homeostasis cause premature lethality in mice lacking the BH3-only proteins Bim and Bmf. *Blood* **123**, 2652-2662, doi:10.1182/blood-2013-11-537217 (2014).
- 213 Haftmann, C. *et al.* miR-148a is upregulated by Twist1 and T-bet and promotes Th1-cell survival by regulating the proapoptotic gene Bim. *Eur J Immunol* **45**, 1192-1205, doi:10.1002/eji.201444633 (2015).
- 214 Chan, F. K. *et al.* A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-2354 (2000).
- 215 Siegel, R. M. *et al.* Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-2357 (2000).

- 216 Itoh, N. & Nagata, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* **268**, 10932-10937 (1993).
- 217 Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178 (1993).
- 218 Holler, N. *et al.* Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* **23**, 1428-1440 (2003).
- 219 Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733, doi:10.1038/385729a0 (1997).
- 220 Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
- 221 Eberstadt, M. *et al.* NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* **392**, 941-945, doi:10.1038/31972 (1998).
- 222 Kischkel, F. C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**, 5579-5588 (1995).
- 223 Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J. & Blenis, J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* **8**, 1001-1008 (1998).
- 224 Chandler, J. M., Cohen, G. M. & MacFarlane, M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem* **273**, 10815-10818 (1998).
- 225 Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50, doi:10.1038/34112 (1998).
- 226 Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**, 1675-1687, doi:10.1093/emboj/17.6.1675 (1998).
- 227 Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
- 228 Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).
- 229 Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**, 11549-11556 (1999).
- 230 Thome, M. *et al.* Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-521, doi:10.1038/386517a0 (1997).
- 231 Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H. & Cory, S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* **14**, 6136-6147 (1995).
- 232 Shao, W. H. & Cohen, P. L. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **13**, 202, doi:10.1186/ar3206 (2011).
- 233 Horino, K. *et al.* A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer, in phagocytic clearance of apoptotic cells. *Lab Invest* **78**, 603-617 (1998).
- 234 Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282-286, doi:10.1038/nature08296 (2009).

- 235 Gardai, S. J. *et al.* Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123**, 321-334, doi:10.1016/j.cell.2005.08.032 (2005).
- 236 Bournazou, I. *et al.* Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest* **119**, 20-32, doi:10.1172/JCI36226 (2009).
- 237 Scott, R. S. *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207-211, doi:10.1038/35075603 (2001).
- 238 Cohen, P. L. *et al.* Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* **196**, 135-140 (2002).
- 239 Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. & Lemke, G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124-1136, doi:10.1016/j.cell.2007.10.034 (2007).
- 240 Nakayama, M. *et al.* Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* **113**, 3821-3830, doi:10.1182/blood-2008-10-185884 (2009).
- 241 Rodriguez-Manzanet, R. *et al.* T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8706-8711, doi:10.1073/pnas.0910359107 (2010).
- 242 Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y. & Nagata, S. Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation. *Genes Dev* **16**, 2662-2671, doi:10.1101/gad.1022802 (2002).
- 243 Kawane, K. *et al.* Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol* **4**, 138-144, doi:10.1038/ni881 (2003).
- 244 Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. & Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* **112**, 358-404, doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013 (2006).
- 245 Burnstock, G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S172-181, doi:10.1038/sj.bjp.0706429 (2006).
- 246 Ralevic, V. & Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**, 413-492 (1998).
- 247 Stojilkovic, S. S. *et al.* Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann N Y Acad Sci* **1048**, 116-130, doi:10.1196/annals.1342.011 (2005).
- 248 North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067, doi:10.1152/physrev.00015.2002 (2002).
- 249 Karasawa, A. & Kawate, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.22153 (2016).
- 250 Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T. & Gouaux, E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* **460**, 592-598, doi:10.1038/nature08198 (2009).
- 251 Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1471-1483, doi:10.1007/s00018-007-6497-0 (2007).
- 252 Antonio, L. S. *et al.* P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br J Pharmacol* **163**, 1069-1077, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01303.x (2011).

- 253 Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. & Stojilkovic, S. S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* **63**, 641-683, doi:10.1124/pr.110.003129 (2011).
- 254 Seman, M. *et al.* NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* **19**, 571-582 (2003).
- 255 Volonte, C., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Colpi, M. & Burnstock, G. P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther* **112**, 264-280, doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.012 (2006).
- 256 Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. A. & Surprenant, A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* **519 Pt 2**, 335-346 (1999).
- 257 Williams, M. & Jarvis, M. F. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* **59**, 1173-1185 (2000).
- 258 Bardoni, R., Goldstein, P. A., Lee, C. J., Gu, J. G. & MacDermott, A. B. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* **17**, 5297-5304 (1997).
- 259 Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G. & Ford, A. P. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* **452**, 513-537, doi:10.1007/s00424-006-0070-9 (2006).
- 260 Khakh, B. S. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**, 165-174, doi:10.1038/35058521 (2001).
- 261 Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A. & Surprenant, A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* **20**, 6347-6358, doi:10.1093/emboj/20.22.6347 (2001).
- 262 Roger, S., Pelegrin, P. & Surprenant, A. Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci* **28**, 6393-6401, doi:10.1523/JNEUROSCI.0696-08.2008 (2008).
- 263 Smart, M. L. *et al.* P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* **278**, 8853-8860, doi:10.1074/jbc.M211094200 (2003).
- 264 Gonnord, P. *et al.* Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* **23**, 795-805, doi:10.1096/fj.08-114637 (2009).
- 265 Becker, D. *et al.* The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem* **283**, 25725-25734, doi:10.1074/jbc.M803855200 (2008).
- 266 Adinolfi, E. *et al.* Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* **24**, 3393-3404, doi:10.1096/fj.09-153601 (2010).
- 267 Elliott, J. I., McVey, J. H. & Higgins, C. F. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis Res Ther* **7**, R468-475, doi:10.1186/ar1699 (2005).
- 268 Wiley, J. S., Chen, R. & Jamieson, G. P. The ATP4- receptor-operated channel (P2Z class) of human lymphocytes allows Ba²⁺ and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch Biochem Biophys* **305**, 54-60, doi:10.1006/abbi.1993.1392 (1993).
- 269 Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. & Buell, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **272**, 735-738 (1996).

- 270 Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* **25**, 5071-5082, doi:10.1038/sj.emboj.7601378 (2006).
- 271 Rigato, C. *et al.* Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J Neurosci* **32**, 11559-11573, doi:10.1523/JNEUROSCI.1042-12.2012 (2012).
- 272 Ousingsawat, J. *et al.* Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat Commun* **6**, 6245, doi:10.1038/ncomms7245 (2015).
- 273 Karasawa, A., Michalski, K., Mikhelzon, P. & Kawate, T. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.31186 (2017).
- 274 Le Gall, S. M. *et al.* ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* **20**, 1785-1794, doi:10.1091/mbc.E08-11-1135 (2009).
- 275 Delarasse, C. *et al.* Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* **109**, 846-857, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06008.x (2009).
- 276 Gu, B., Bendall, L. J. & Wiley, J. S. Adenosine triphosphate-induced shedding of CD23 and L-selectin (CD62L) from lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases. *Blood* **92**, 946-951 (1998).
- 277 Ferrari, D. *et al.* P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* **447**, 71-75 (1999).
- 278 Auger, R., Motta, I., Benihoud, K., Ojcius, D. M. & Kanellopoulos, J. M. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* **280**, 28142-28151, doi:10.1074/jbc.M501290200 (2005).
- 279 Tsukimoto, M. *et al.* P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways. *J Immunol* **177**, 2842-2850 (2006).
- 280 Wiley, J. S. & Gu, B. J. A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic Signal* **8**, 579-586, doi:10.1007/s11302-012-9308-5 (2012).
- 281 Cheewatrakoolpong, B., Gilcrest, H., Anthes, J. C. & Greenfeder, S. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 17-27, doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.087 (2005).
- 282 Skarratt, K. K. *et al.* A 5' intronic splice site polymorphism leads to a null allele of the P2X7 gene in 1-2% of the Caucasian population. *FEBS Lett* **579**, 2675-2678, doi:10.1016/j.febslet.2005.03.091 (2005).
- 283 Feng, Y. H., Li, X., Wang, L., Zhou, L. & Gorodeski, G. I. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* **281**, 17228-17237, doi:10.1074/jbc.M602999200 (2006).

- 284 Nicke, A. *et al.* A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* **284**, 25813-25822, doi:10.1074/jbc.M109.033134 (2009).
- 285 Xu, X. J. *et al.* Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *J Cell Sci* **125**, 3776-3789, doi:10.1242/jcs.099374 (2012).
- 286 Schwarz, N. *et al.* Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS One* **7**, e41269, doi:10.1371/journal.pone.0041269 (2012).
- 287 Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-426 (2002).
- 288 Andrei, C. *et al.* Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9745-9750, doi:10.1073/pnas.0308558101 (2004).
- 289 Franceschini, A. *et al.* The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J* **29**, 2450-2461, doi:10.1096/fj.14-268714 (2015).
- 290 Barbera-Cremades, M. *et al.* P2X7 Receptor Induces Tumor Necrosis Factor-alpha Converting Enzyme Activation and Release to Boost TNF-alpha Production. *Front Immunol* **8**, 862, doi:10.3389/fimmu.2017.00862 (2017).
- 291 Ferrari, D., Stroh, C. & Schulze-Osthoff, K. P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *J Biol Chem* **274**, 13205-13210 (1999).
- 292 Loomis, W. H., Namiki, S., Ostrom, R. S., Insel, P. A. & Junger, W. G. Hypertonic stress increases T cell interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **278**, 4590-4596, doi:10.1074/jbc.M207868200 (2003).
- 293 Schenk, U. *et al.* Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* **1**, ra6, doi:10.1126/scisignal.1160583 (2008).
- 294 Yip, L. *et al.* Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* **23**, 1685-1693, doi:10.1096/fj.08-126458 (2009).
- 295 Schenk, U. *et al.* ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* **4**, ra12, doi:10.1126/scisignal.2001270 (2011).
- 296 Atarashi, K. *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808-812, doi:10.1038/nature07240 (2008).
- 297 Purvis, H. A., Anderson, A. E., Young, D. A., Isaacs, J. D. & Hilkens, C. M. A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *J Immunol* **193**, 1142-1150, doi:10.4049/jimmunol.1302467 (2014).
- 298 Proietti, M. *et al.* ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism. *Immunity* **41**, 789-801, doi:10.1016/j.immuni.2014.10.010 (2014).
- 299 Heiss, K. *et al.* High sensitivity of intestinal CD8+ T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses. *J Immunol* **181**, 3861-3869 (2008).

- 300 Aswad, F., Kawamura, H. & Dennert, G. 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 (2005).
- 301 Labasi, J. M. *et al.* Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* **168**, 6436-6445 (2002).
- 302 Taylor, S. R., Alexander, D. R., Cooper, J. C., Higgins, C. F. & Elliott, J. I. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J Immunol* **178**, 3474-3482 (2007).
- 303 Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 107-137, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946 (2003).
- 304 Bonardelle, D., Benihoud, K., Kiger, N. & Bobé, P. B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J Leukoc Biol* **78**, 1052-1059, doi:10.1189/jlb.0904536 (2005).
- 305 Hadj-Slimane, R., Chelbi-Alix, M. K., Tovey, M. G. & Bobé, P. An essential role for IFN-alpha in the overexpression of Fas ligand on MRL/lpr lymphocytes and on their spontaneous Fas-mediated cytotoxic potential. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 717-728, doi:10.1089/jir.2004.24.717 (2004).
- 306 Bonardelle, D. *et al.* Inflammatory arthropathy in MRL hematopoietic chimeras undergoing Fas mediated graft-versus-host syndrome. *J Rheumatol* **28**, 956-961 (2001).
- 307 Benihoud, K., Bonardelle, D., Bobé, P. & Kiger, N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol* **27**, 415-420, doi:10.1002/eji.1830270211 (1997).
- 308 Bobé, P. *et al.* Fas-mediated liver damage in MRL hemopoietic chimeras undergoing lpr-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol* **159**, 4197-4204 (1997).
- 309 Benihoud, K. *et al.* Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain. *Oncogene* **21**, 5593-5600, doi:10.1038/sj.onc.1205730 (2002).
- 310 Martina, M. N., Noel, S., Saxena, A., Rabb, H. & Hamad, A. R. Double negative (DN) alphabeta T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol Cell Biol* **93**, 305-310, doi:10.1038/icb.2014.99 (2015).
- 311 Mohamood, A. S. *et al.* Gld mutation of Fas ligand increases the frequency and up-regulates cell survival genes in CD25+CD4+ TR cells. *Int Immunol* **18**, 1265-1277, doi:10.1093/intimm/dxl057 (2006).
- 312 Renno, T. *et al.* Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* **28**, 540-547, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<540::AID-IMMU540>3.0.CO;2-Y (1998).
- 313 Bleesing, J. J., Morrow, M. R., Uzel, G. & Fleisher, T. A. Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* **213**, 72-81, doi:10.1006/cimm.2001.1865 (2001).
- 314 Benbijja, M., Mellouk, A. & Bobé, P. Sensitivity of leukemic T-cell lines to arsenic trioxide cytotoxicity is dependent on the induction of phosphatase B220/CD45R expression at the cell surface. *Mol Cancer* **13**, 251, doi:10.1186/1476-4598-13-251 (2014).

- 315 Mohamood, A. S. *et al.* Fas-mediated apoptosis regulates the composition of peripheral alphabeta T cell repertoire by constitutively purging out double negative T cells. *PLoS One* **3**, e3465, doi:10.1371/journal.pone.0003465 (2008).
- 316 Landolfi, M. M. *et al.* CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J Immunol* **151**, 1086-1096 (1993).
- 317 Pestano, G. A. *et al.* Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* **284**, 1187-1191 (1999).
- 318 Mixter, P. F., Russell, J. Q., Durie, F. H. & Budd, R. C. Decreased CD4-CD8- TCR-alpha beta + cells in lpr/lpr mice lacking beta 2-microglobulin. *J Immunol* **154**, 2063-2074 (1995).
- 319 Giese, T. & Davidson, W. F. In CD8+ T cell-deficient lpr/lpr mice, CD4+B220+ and CD4+B220- T cells replace B220+ double-negative T cells as the predominant populations in enlarged lymph nodes. *J Immunol* **154**, 4986-4995 (1995).
- 320 Kinjyo, I. *et al.* Cutting edge: Lymphoproliferation caused by Fas deficiency is dependent on the transcription factor eomesodermin. *J Immunol* **185**, 7151-7155, doi:10.4049/jimmunol.1003193 (2010).
- 321 Bristeau-Leprince, A. *et al.* Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells. *J Immunol* **181**, 440-448 (2008).
- 322 Trimble, L. A., Prince, K. A., Pestano, G. A., Daley, J. & Cantor, H. Fas-dependent elimination of nonselected CD8 cells and lpr disease. *J Immunol* **168**, 4960-4967 (2002).
- 323 Rensing-Ehl, A. *et al.* Abnormally differentiated CD4+ or CD8+ T cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency. *Blood* **124**, 851-860, doi:10.1182/blood-2014-03-564286 (2014).
- 324 Juvet, S. C. *et al.* Autocrine IFNgamma controls the regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells. *PLoS One* **7**, e47732, doi:10.1371/journal.pone.0047732 (2012).
- 325 Juvet, S. C. & Zhang, L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol* **4**, 48-58, doi:10.1093/jmcb/mjr043 (2012).
- 326 Chen, L. & Brosnan, C. F. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R-/- mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* **176**, 3115-3126 (2006).
- 327 Labasi, J. M. *et al.* Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of immunology* **168**, 6436-6445 (2002).
- 328 Chen, L. & Brosnan, C. F. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R-/- mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *Journal of immunology* **176**, 3115-3126 (2006).
- 329 Schenk, U. *et al.* Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* **1**, ra6 (2008).
- 330 Le Gall, S. M. *et al.* Loss of P2X7 receptor plasma membrane expression and function in pathogenic B220+ double-negative T lymphocytes of autoimmune MRL/lpr mice. *PLoS One* **7**, e52161, doi:10.1371/journal.pone.0052161 (2012).

- 331 Portales-Cervantes, L. *et al.* Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* **71**, 818-825, doi:10.1016/j.humimm.2010.05.008 (2010).
- 332 Portales-Cervantes, L. *et al.* The His155Tyr (489C>T) single nucleotide polymorphism of P2RX7 gene confers an enhanced function of P2X7 receptor in immune cells from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* **276**, 168-175, doi:10.1016/j.cellimm.2012.05.005 (2012).
- 333 Figliuolo, V. R. *et al.* P2X7 receptor promotes intestinal inflammation in chemically induced colitis and triggers death of mucosal regulatory T cells. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 1183-1194, doi:10.1016/j.bbadis.2017.03.004 (2017).
- 334 Idzko, M., Ferrari, D. & Eltzschig, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* **509**, 310-317, doi:10.1038/nature13085 (2014).
- 335 Neves, A. R. *et al.* Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **20**, 444-457, doi:10.1097/01.MIB.0000441201.10454.06 (2014).
- 336 Eser, A. *et al.* Efficacy and safety of eltrombopag in treatment-refractory primary immune thrombocytopenia: a retrospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis* **27**, 47-52, doi:10.1097/MBC.0000000000000380 (2016).
- 337 Stock, T. C. *et al.* Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *J Rheumatol* **39**, 720-727, doi:10.3899/jrheum.110874 (2012).
- 338 Sharp, A. J. *et al.* P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* **5**, 33, doi:10.1186/1742-2094-5-33 (2008).
- 339 Grayson, J. M., Weant, A. E., Holbrook, B. C. & Hildeman, D. Role of Bim in regulating CD8+ T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* **80**, 8627-8638, doi:10.1128/JVI.00855-06 (2006).
- 340 Sedger, L. M. *et al.* Extreme lymphoproliferative disease and fatal autoimmune thrombocytopenia in FasL and TRAIL double-deficient mice. *Blood* **115**, 3258-3268, doi:10.1182/blood-2009-11-255497 (2010).
- 341 Bashal, F. Hematological disorders in patients with systemic lupus erythematosus. *Open Rheumatol J* **7**, 87-95, doi:10.2174/1874312901307010087 (2013).
- 342 Suarez-Fueyo, A., Bradley, S. J. & Tsokos, G. C. T cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Opin Immunol* **43**, 32-38, doi:10.1016/j.coi.2016.09.001 (2016).
- 343 Alirezaei, M. *et al.* Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis. *Autophagy* **5**, 152-158 (2009).
- 344 Kovacs, J. R. *et al.* Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ* **19**, 144-152, doi:10.1038/cdd.2011.78 (2012).
- 345 International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus, G. *et al.* Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* **40**, 204-210, doi:10.1038/ng.81 (2008).
- 346 Alessandri, C. *et al.* T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J* **26**, 4722-4732, doi:10.1096/fj.12-206060 (2012).

- 347 Gros, F. *et al.* Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy* **8**, 1113-1123, doi:10.4161/auto.20275 (2012).
- 348 Caza, T. N. *et al.* HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE. *Ann Rheum Dis* **73**, 1888-1897, doi:10.1136/annrheumdis-2013-203794 (2014).
- 349 Clarke, A. J. *et al.* Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann Rheum Dis* **74**, 912-920, doi:10.1136/annrheumdis-2013-204343 (2015).
- 350 Arnold, J., Murera, D., Arbogast, F., Muller, S. & Gros, F. [Autophagy in T and B cell homeostasis: recycling for sustainable growth]. *Med Sci (Paris)* **32**, 281-289, doi:10.1051/medsci/20163203013 (2016).
- 351 Muller, S. [Autophagy, autoimmunity and autoimmune diseases]. *Med Sci (Paris)* **33**, 319-327, doi:10.1051/medsci/20173303020 (2017).
- 352 Clark, L. B. *et al.* Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol* **162**, 2546-2554 (1999).
- 353 Ramsdell, F. & Ziegler, S. F. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev Immunol* **14**, 343-349, doi:10.1038/nri3650 (2014).
- 354 Lo, B. & Abdel-Motal, U. M. Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition. *Curr Opin Immunol* **49**, 14-19, doi:10.1016/j.coi.2017.07.014 (2017).
- 355 Tivol, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541-547 (1995).
- 356 Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* **270**, 985-988 (1995).
- 357 Kuehn, H. S. *et al.* Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* **345**, 1623-1627, doi:10.1126/science.1255904 (2014).
- 358 Lo, B. *et al.* AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* **349**, 436-440, doi:10.1126/science.aaa1663 (2015).
- 359 Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S. & Radic, M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun* **1**, 194-201, doi:10.1159/000206974 (2009).
- 360 Schnabel, A., Csernok, E., Isenberg, D. A., Mrowka, C. & Gross, W. L. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. Prevalence, specificities, and clinical significance. *Arthritis Rheum* **38**, 633-637 (1995).
- 361 Bennett, L. *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**, 711-723, doi:10.1084/jem.20021553 (2003).
- 362 Hakkim, A. *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9813-9818, doi:10.1073/pnas.0909927107 (2010).
- 363 Macanovic, M. & Lachmann, P. J. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. *Clin Exp Immunol* **108**, 220-226 (1997).

- 364 Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y. Y. & Morel, L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 271694, doi:10.1155/2011/271694 (2011).
- 365 Waters, S. T. *et al.* Breaking tolerance to double stranded DNA, nucleosome, and other nuclear antigens is not required for the pathogenesis of lupus glomerulonephritis. *J Exp Med* **199**, 255-264, doi:10.1084/jem.20031519 (2004).
- 366 Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G. & Rosen, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* **179**, 1317-1330 (1994).
- 367 Wermeling, F. *et al.* Class A scavenger receptors regulate tolerance against apoptotic cells, and autoantibodies against these receptors are predictive of systemic lupus. *J Exp Med* **204**, 2259-2265, doi:10.1084/jem.20070600 (2007).
- 368 Jacob, C. O. *et al.* Development of systemic lupus erythematosus in NZM 2328 mice in the absence of any single BAFF receptor. *Arthritis Rheum* **65**, 1043-1054, doi:10.1002/art.37846 (2013).
- 369 Blanco, P., Ueno, H. & Schmitt, N. T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis. *Eur J Immunol* **46**, 281-290, doi:10.1002/eji.201545760 (2016).
- 370 Li, W., Titov, A. A. & Morel, L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol* **29**, 434-441, doi:10.1097/BOR.0000000000000412 (2017).
- 371 Choi, J. Y. *et al.* Disruption of Pathogenic Cellular Networks by IL-21 Blockade Leads to Disease Amelioration in Murine Lupus. *J Immunol* **198**, 2578-2588, doi:10.4049/jimmunol.1601687 (2017).
- 372 Hu, Y. L., Metz, D. P., Chung, J., Siu, G. & Zhang, M. B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells. *J Immunol* **182**, 1421-1428 (2009).
- 373 Teichmann, L. L. *et al.* Local triggering of the ICOS coreceptor by CD11c(+) myeloid cells drives organ inflammation in lupus. *Immunity* **42**, 552-565, doi:10.1016/j.immuni.2015.02.015 (2015).
- 374 Takaba, H. *et al.* Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* **163**, 975-987, doi:10.1016/j.cell.2015.10.013 (2015).
- 375 Takaba, H. & Takayanagi, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol* **38**, 805-816, doi:10.1016/j.it.2017.07.010 (2017).
- 376 Fairhurst, A. M. *et al.* Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol* **38**, 1971-1978, doi:10.1002/eji.200838138 (2008).
- 377 Hooks, J. J. *et al.* Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* **301**, 5-8, doi:10.1056/NEJM197907053010102 (1979).
- 378 Bezalel, S., Guri, K. M., Elbirt, D., Asher, I. & Stoeber, Z. M. Type I interferon signature in systemic lupus erythematosus. *Isr Med Assoc J* **16**, 246-249 (2014).
- 379 Lourenco, E. V. & La Cava, A. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med* **9**, 242-254 (2009).
- 380 Crow, M. K. Type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Top Microbiol Immunol* **316**, 359-386 (2007).
- 381 Santiago-Raber, M. L. *et al.* Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med* **197**, 777-788, doi:10.1084/jem.20021996 (2003).

- 382 Mathian, A., Weinberg, A., Gallegos, M., Banchereau, J. & Koutouzov, S. IFN-alpha induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J Immunol* **174**, 2499-2506 (2005).
- 383 Hron, J. D. & Peng, S. L. Type I IFN protects against murine lupus. *J Immunol* **173**, 2134-2142 (2004).
- 384 Jacob, C. O., van der Meide, P. H. & McDevitt, H. O. In vivo treatment of (NZB X NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J Exp Med* **166**, 798-803 (1987).
- 385 Haas, C., Ryffel, B. & Le Hir, M. IFN-gamma receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZB x NZW)F1 mice. *J Immunol* **160**, 3713-3718 (1998).
- 386 Balomenos, D., Rumold, R. & Theofilopoulos, A. N. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* **101**, 364-371, doi:10.1172/JCI750 (1998).
- 387 Mellor-Pita, S. *et al.* Monocytes and T lymphocytes contribute to a predominance of interleukin 6 and interleukin 10 in systemic lupus erythematosus. *Cytometry B Clin Cytom* **76**, 261-270, doi:10.1002/cyto.b.20468 (2009).
- 388 Chun, H. Y. *et al.* Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* **27**, 461-466, doi:10.1007/s10875-007-9104-0 (2007).
- 389 Robinson, E. S. & Werth, V. P. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine* **73**, 326-334, doi:10.1016/j.cyto.2015.01.031 (2015).
- 390 Lieberman, L. A. & Tsokos, G. C. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 740619, doi:10.1155/2010/740619 (2010).
- 391 Tokano, Y. *et al.* Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin Exp Immunol* **116**, 169-173 (1999).
- 392 Lauwerys, B. R., Van Snick, J. & Houssiau, F. A. Serum IL-12 in systemic lupus erythematosus: absence of p70 heterodimers but presence of p40 monomers correlating with disease activity. *Lupus* **11**, 384-387, doi:10.1191/0961203302lu213oa (2002).
- 393 Moulton, V. R. & Tsokos, G. C. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *J Clin Invest* **125**, 2220-2227, doi:10.1172/JCI78087 (2015).
- 394 Kytтарыs, V. C., Zhang, Z., Kuchroo, V. K., Oukka, M. & Tsokos, G. C. Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *J Immunol* **184**, 4605-4609, doi:10.4049/jimmunol.0903595 (2010).
- 395 Benihoud, K., Bonardelle, D., Bobé, P. & Kiger, N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol* **27**, 415-420, doi:10.1002/eji.1830270211 (1997).
- 396 Bonardelle, D., Benihoud, K., Kiger, N. & Bobé, P. B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J Leukoc Biol* **78**, 1052-1059, doi:10.1189/jlb.0904536 (2005).
- 397 Adachi, M. *et al.* Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nature genetics* **11**, 294-300, doi:10.1038/ng1195-294 (1995).
- 398 Bobé, P. *et al.* Fas-mediated liver damage in MRL hemopoietic chimeras undergoing lpr-mediated graft-versus-host disease. *Journal of immunology* **159**, 4197-4204 (1997).

- 399 Bonardelle, D. *et al.* Inflammatory arthropathy in MRL hematopoietic chimeras undergoing Fas mediated graft-versus-host syndrome. *The Journal of rheumatology* **28**, 956-961 (2001).
- 400 Bidère, N., Su, H. C. & Lenardo, M. J. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* **24**, 321-352 (2006).
- 401 Bleesing, J. J., Morrow, M. R., Uzel, G. & Fleisher, T. A. Human T cell activation induces the expression of a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and is associated with altered O-glycan synthesis and onset of apoptosis. *Cell Immunol* **213**, 72-81 (2001).
- 402 Renno, T. *et al.* Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* **28**, 540-547 (1998).
- 403 Izui, S. *et al.* Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. *Journal of immunology* **133**, 227-233 (1984).
- 404 Kelley, V. E. & Roths, J. B. Interaction of mutant *lpr* gene with background strain influences renal disease. *Clinical immunology and immunopathology* **37**, 220-229 (1985).
- 405 Marion, T. N. & Postlethwaite, A. E. Chance, genetics, and the heterogeneity of disease and pathogenesis in systemic lupus erythematosus. *Seminars in immunopathology* **36**, 495-517, doi:10.1007/s00281-014-0440-x (2014).
- 406 Li, W., Titov, A. A. & Morel, L. An update on lupus animal models. *Current opinion in rheumatology* **29**, 434-441, doi:10.1097/BOR.0000000000000412 (2017).
- 407 Nath, S. K. *et al.* Linkage at 12q24 with systemic lupus erythematosus (SLE) is established and confirmed in Hispanic and European American families. *Am J Hum Genet* **74**, 73-82 (2004).
- 408 Elliott, J. I., McVey, J. H. & Higgins, C. F. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis research & therapy* **7**, R468-475, doi:10.1186/ar1699 (2005).
- 409 Portales-Cervantes, L. *et al.* Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Human immunology* **71**, 818-825, doi:10.1016/j.humimm.2010.05.008 (2010).
- 410 Chen, G. M. *et al.* Association of P2X7R gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Mutagenesis* **28**, 351-355, doi:10.1093/mutage/get007 (2013).
- 411 Witting, A. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6362-6367, doi:10.1073/pnas.0510418103 (2006).
- 412 Kurashima, Y. *et al.* Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature communications* **3**, 1034, doi:10.1038/ncomms2023 (2012).
- 413 Solle, M. *et al.* Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* **276**, 125-132, doi:10.1074/jbc.M006781200 (2001).
- 414 Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232, doi:10.1038/nature04515 (2006).
- 415 Le Gall, S. M. *et al.* ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Molecular biology of the cell* **20**, 1785-1794, doi:10.1091/mbc.E08-11-1135 (2009).

- 416 Yip, L. *et al.* Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *Faseb J* **23**, 1685-1693 (2009).
- 417 Schenk, U. *et al.* ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* **4**, ra12, doi:10.1126/scisignal.2001270 (2011).
- 418 Purvis, H. A., Anderson, A. E., Young, D. A., Isaacs, J. D. & Hilkens, C. M. A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses. *Journal of immunology* **193**, 1142-1150, doi:10.4049/jimmunol.1302467 (2014).
- 419 Safya, H. *et al.* Variations in Cellular Responses of Mouse T Cells to Adenosine-5'-Triphosphate Stimulation Do Not Depend on P2X7 Receptor Expression Levels but on Their Activation and Differentiation Stage. *Frontiers in immunology* **9**, 360, doi:10.3389/fimmu.2018.00360 (2018).
- 420 Rodriguez, C. I. *et al.* High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* **25**, 139-140, doi:10.1038/75973 (2000).
- 421 Tinhofer, I. *et al.* Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **91**, 4273-4281 (1998).
- 422 Ogasawara, J. *et al.* Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**, 806-809, doi:10.1038/364806a0 (1993).
- 423 Amstrup, J. & Novak, I. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochem J* **374**, 51-61, doi:10.1042/BJ20030585 (2003).
- 424 Tsukimoto, M., Tokunaga, A., Harada, H. & Kojima, S. Blockade of murine T cell activation by antagonists of P2Y6 and P2X7 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 512-518, doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.011 (2009).
- 425 Sluyter, R. & Wiley, J. P2X7 receptor activation induces CD62L shedding from human CD4+ and CD8+ T cells. *Inflammation and Cell Signaling* **1**, 44-49, doi:10.14800/ics.9210.14800/ics.92 (2014).
- 426 Gargett, C. E., Cornish, J. E. & Wiley, J. S. ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* **122**, 911-917, doi:10.1038/sj.bjp.0701447 (1997).
- 427 Bankovich, A. J., Shiow, L. R. & Cyster, J. G. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem* **285**, 22328-22337, doi:10.1074/jbc.M110.123299 (2010).
- 428 Yang, S., Liu, F., Wang, Q. J., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One* **6**, e22560, doi:10.1371/journal.pone.0022560 (2011).
- 429 Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C. & Dahl, G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* **581**, 483-488, doi:10.1016/j.febslet.2006.12.056 (2007).
- 430 Adinolfi, E. *et al.* Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem* **284**, 10120-10128, doi:10.1074/jbc.M805805200 (2009).

- 431 Bagnoli, M., Canevari, S. & Mezzanzanica, D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 210-213, doi:10.1016/j.biocel.2009.11.015 (2010).
- 432 Li, F. *et al.* Both FOXO3a and FOXO1 are involved in the HGF-protective pathway against apoptosis in endothelial cells. *Cell Biol Int* **39**, 1131-1137, doi:10.1002/cbin.10486 (2015).
- 433 Pfeiffer, Z. A. *et al.* The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J Leukoc Biol* **75**, 1173-1182, doi:10.1189/jlb.1203648 (2004).
- 434 Beneteau, M. *et al.* Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res* **6**, 604-613, doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0331 (2008).

Abstract

My project aims to determine the role of the purinergic receptor P2X7 (P2X7R) in the pathophysiological processes involved in the development of autoimmune lupus-like syndrome. MRL/lpr mice, deficient for the cell death receptor Fas (lpr mutation), spontaneously develop this pathology following the accumulation of pathogenic B220⁺CD4⁻CD8⁻ (DN) T lymphocytes in secondary lymphoid organs. We have observed that these lymphocytes are also deficient in P2X7R cell surface expression. This led us to hypothesize that P2X7R could play a key role in T cell homeostasis and lupus development. To test our hypothesis, we produced B6 mice deficient for both Fas (lpr) and P2X7R (P2X7KO). These mice, but not single mutant B6 mice (lpr or P2X7KO), develop a massive accumulation of DN B220⁺ T lymphocytes and high levels of autoantibodies and proinflammatory cytokines, confirming for the first time the involvement of P2X7R in T-cell homeostasis. I have found that the pathogenic DN T lymphocytes are predominantly derived from the CD8⁺ T lymphocyte subpopulation. Chronic inflammation in B6/lpr-P2X7KO mice induces the activation of the whole CD4⁺ and CD8⁺ naïve T lymphocyte subpopulations leading to the accumulation of Effector/Memory and exhausted T lymphocytes. Accumulated T-cells lose the ability to be reactivated. To confirm these results, I compared the adaptive immune response against adenovirus between mice deficient for Fas (lpr mutation), P2X7R-deficient mice or both receptors. The cellular and the humoral responses were lower in the B6/lpr-P2X7KO mouse strain compared to B6, B6-P2X7KO and B6/lpr mouse strains. The antiviral immune response in the B6/lpr mice was lower than in B6 and B6-P2X7KO mice. These results reinforce our hypothesis about the synergistic role of both receptors in the maintaining of T cell homeostasis. Our results suggest that Fas and P2X7R play their synergistic role in T-cell homeostasis. In collaboration with a team from the University of Taiwan, we sequenced the mRNAs expressed in the spleen and lymph nodes of MRL/lpr mice before and after the onset of the diseases as well as in the B6, B6/lpr, B6-P2X7KO and B6/lpr-P2X7KO mouse strains in order to better understand the mechanism triggering the disease and to identify the role of each receptor on the expression of the susceptibility *loci*.

Title : immune Role of purinergic P2X7 and apoptosis Fas receptors in T lymphocyte homeostasis and autoimmune disease development

Key words : P2X7, Fas, autoimmune diseases, homeostasis, T lymphocytes.

Résumé : My project aims to determine the role of the purinergic receptor P2X7 (P2X7R) in the pathophysiological processes involved in the development of autoimmune lupus-like syndrome. MRL/lpr mice, deficient for the cell death receptor Fas (lpr mutation), spontaneously develop this pathology following the accumulation of pathogenic B220⁺CD4⁻CD8⁻ (DN) T lymphocytes in secondary lymphoid organs. We have observed that these lymphocytes are also deficient in P2X7R cell surface expression. This led us to hypothesize that P2X7R could play a key role in T cell homeostasis and lupus development. To test our hypothesis, we produced B6 mice deficient for both Fas (lpr) and P2X7R (P2X7KO). These mice, but not single mutant B6 mice (lpr or P2X7KO), develop a massive accumulation of DN B220⁺ T lymphocytes and high levels of autoantibodies and proinflammatory cytokines, confirming for the first time the involvement of P2X7R in T-cell homeostasis. I have found that the pathogenic DN T lymphocytes are predominantly derived from the CD8⁺ T lymphocyte subpopulation. Chronic inflammation in B6/lpr-P2X7KO mice induces the activation of the whole CD4⁺ and CD8⁺ naïve T lymphocyte subpopulations leading to the accumulation of Effector/Memory and exhausted T lymphocytes. Accumulated T-cells lose the ability to be reactivated. To confirm these results, I compared the adaptive immune response against adenovirus between mice deficient for Fas (lpr mutation), P2X7R-deficient mice or both receptors. The cellular and the humoral responses were lower in the B6/lpr-P2X7KO mouse strain compared to B6, B6-P2X7KO and B6/lpr mouse strains. The antiviral immune response in the B6/lpr mice was lower than in B6 and B6-P2X7KO mice. These results

reinforce our hypothesis about the synergistic role of both receptors in the maintaining of T cell homeostasis. Our results suggest that Fas and P2X7R play their synergistic role in T-cell homeostasis. In collaboration with a team from the University of Taiwan, we sequenced the mRNAs expressed in the spleen and lymph nodes of MRL/lpr mice before and after the onset of the diseases as well as in the B6, B6/lpr, B6-P2X7KO and B6/lpr-P2X7KO mouse strains in order to better understand the mechanism triggering the disease and to identify the role of each receptor on the expression of the susceptibility *loci*.



Titre : Rôle des récepteurs purinergiques P2X7 et d'apoptose Fas dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement des maladies auto-immunes

Mots clés : P2X7, Fas, Auto-immunité, homéostasie, lymphocytes T.

Résumé : Mon étude a porté sur le rôle du récepteur purinergique P2X7 (P2X7R) dans les processus physiopathologiques impliqués dans le développement des maladies auto-immunes de type lupique. Les souris MRL/*lpr*, déficientes en récepteurs d'apoptose Fas (mutation *lpr*), développent spontanément un lupus érythémateux systémique suite à l'accumulation de lymphocytes T pathogéniques CD4⁻CD8⁻ (DN) B220⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. Nous avons observé que ces lymphocytes ont un déficit d'expression en P2X7R à leur surface ce qui nous a amené à postuler que P2X7R pourrait jouer un rôle clef dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement du lupus. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons produit des souris C57BL/6J (B6) déficientes simultanément pour Fas (*lpr*) et P2X7R (P2X7KO). Les souris B6/*lpr*-P2X7KO présentent une accumulation massive de lymphocytes T DN B220⁺, des titres très élevés en auto-anticorps et une forte dérégulation de l'expression des cytokines ce qui n'est pas le cas pour les souris B6 simples mutantes pour *lpr* ou P2X7KO confirmant pour la première fois l'implication de P2X7R dans l'homéostasie des lymphocytes T, en synergie avec le récepteur Fas. Les lymphocytes T DN pathogéniques, responsables de la lymphoaccumulation, sont issus majoritairement de la sous-population des lymphocytes T CD8⁺. L'inflammation chronique présente chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO induit l'activation de l'ensemble des populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ naïves conduisant à l'accumulation de lymphocytes T Effecteurs/Mémoires de type EM (effecteur mémoire) et CM (central mémoire) qui atteignent parfois le stade *exhausted* PD1⁺TIM3⁺.

Les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et DN B220⁺ qui s'accumulent chez les souris B6/*lpr*-P2X7KO ont une capacité de réactivation réduite. Ce biais fonctionnel et phénotypique a été montré en comparant la réponse immunitaire adaptative, contre un vecteur adénoviral codant pour l'ovalbumine, entre des souris déficientes en Fas et/ou P2X7R. Les réponses cellulaires et humorales sont moins importantes dans les souris B6/*lpr*-P2X7KO que B6 et B6-P2X7KO. Dans les souris B6/*lpr*, on observe un niveau de réponses antigéniques intermédiaire. L'ensemble de ces résultats renforcent notre hypothèse sur le rôle synergique des récepteurs Fas et P2X7R dans l'homéostasie des lymphocytes T et le développement du lupus. Étant donné que le taux d'apoptose induit par l'activation de chacun des récepteurs Fas ou P2X7R est moins important dans les lymphocytes T CD8⁺ que CD4⁺, nous en concluons que la synergie entre les récepteurs Fas et P2X7 serait nécessaire pour l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺. Afin de préciser les mécanismes à l'origine de la maladie développée par les souris B6/*lpr*-P2X7KO et d'identifier l'impact de chaque récepteur sur l'expression des *loci* de susceptibilité au lupus, nous avons séquencé les ARNm exprimés dans la rate et les ganglions lymphatiques des souris MRL/*lpr* avant et après le développement de l'auto-immunité ainsi que chez les souris B6, B6/*lpr*, B6-P2X7KO et B6/*lpr*-P2X7KO et identifié trente gènes candidats.

